SÉRIE : B
N° D'ORDRE : 206
N° DE SÉRIE : 125

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE RENNES

pour obtenir

Le grade de Docteur es-Sciences Physiques

(Mention Biochimie)

par

Marie-Lise THIEULANT
Pharmacien
Attachée de recherche au C.N.R.S.

Contribution à l'étude du mécanisme d'action des androgènes dans l'hypophyse antérieure du rat mâle : Étude de la pénétration et du métabolisme de la testostérone. Mise en évidence de récepteurs.

Soutenue le 25 Avril 1975 devant la Commission d'Examen

P. JOUAN	Professeur	Président
R. MICHEL	Professeur	Rapporteurs
J. DUVAL	Professeur	
Dr P. ROBEL	Maître de recherche au C.N.R.S.	Examinateurs
Dr J. PASQUALINI	Maître de recherche au C.N.R.S.	
Dr S. SAMPEREZ	Chargé de recherche au C.N.R.S.	

SÉRIE : B
N° D'ORDRE : 206
N° DE SÉRIE : 125

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE RENNES

pour obtenir

Le grade de Docteur es-Sciences Physiques
(Mention Biochimie)

par

Marie-Lise THIEULANT
Pharmacien
Attachée de recherche au C.N.R.S.

Contribution à l'étude du mécanisme d'action des androgènes dans l'hypophyse antérieure du rat mâle : Étude de la pénétration et du métabolisme de la testostérone. Mise en évidence de récepteurs.

Soutenue le 25 Avril 1975 devant la Commission d'Examen

P. JOUAN	Professeur	Président
R. MICHEL	Professeur	Rapporteurs
J. DUVAL	Professeur	Rapporteurs
Dr P. ROBEL	Maître de recherche au C.N.R.S.	Examinateurs
Dr J. PASQUALINI	Maître de recherche au C.N.R.S.	Examinateurs
Dr S. SAMPEREZ	Chargé de recherche au C.N.R.S.	Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE RENNES

.....

U.E.R. SCIENCES ET PHILOSOPHIE

.....

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

Professeurs Honoraires

M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON - LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECQ A.

Mathématiques

Professeurs

M. GUERINDON Jean
M. METIVIER Michel
M. GIORGIUTTI Italo
M. TOUGERON Jean-Claude
M. MIGNOT Alain
M. HOUDEBINE Jean
M. KEANE Michaël
M. BOULAYE Guy

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. BERTHELOT Pierre
M. BREEN Lawrence
M. CAMUS Jacques
M. CONZE Pierre
M. FERRAND Daniel
M. GUIVARC'H Yves
M. LE GOUPIL Jean
M. LERMAN Israël
M. NEDELEC Jean-Claude
M. TRILLING Laurent
M. VERJUS Jean-Pierre

Physique

M. VACHER Michel
M. VIGNERON Léopold
M. LE BOT Jean
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN Stéphane
M. LE MONTAGNER Serge
M. MEVEL Jean-Yves
M. MEINNEL Jean
M. REGENSTREIF Edouard
M. BRUN Pierre
M. LE ROUX Emile
M. DUBOST Gérard
M. ARQUES Pierre-Yves
M. HAEUSLER Claude
M. NUSIMOVICI Michel

M. GUIDINI J.
M. DECAMPS E.A.

Professeurs	Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

Chimie

M. VENE Jean	M. TALLEC André
M. LE MOAL Henri	
M. LEVAS E.	
M. PELTIER Daniel	
M. PRIGENT J.	
M. FOUCAUD André	
M. LANG Jean	
M. CARRIE R.	
M. GUERILLOT Claude-Roger	
M. KERFANTO Michel (E.N.S.C.R.)	
M. DABARD René	
M. GRANDJEAN Daniel	
M. LUCAS Jacques	
M. MARTIN Guy	

Chimie Biologique

M. JOUAN Pierre	
M. DUVAL Jacques	

Géologie

M. COGNE Jean	M. HAMEURT Jean-Marie
Melle DURAND Suzanne	M. LARDEUX Hubert
M. BOILLOT Gilbert	

Zoologie

M. RICHARD Gaston	M. CALLEC Jean-Jacques
M. MAILLET Pierre	
M. RAZET Pierre	
M. FOLLIOT Roger	
M. ALLEGRET Paul	
M. MANIEY Jacques	
M. JOLY Jean-Marie	
M. LEFEUVRE J.C.	

Botanique

M. VILLERET Serge	M. TOUFFET Jean
M. CLAUSTRES Georges	
Melle GOAS Gabrielle	
Melle GOAS Marie	
Mme LEMOINE Cécile	

Philosophie

M. ORTIGUES Edmond	M. JACQUES Francis
	M. BEYSSADE Jean-Marie

Cette thèse est dédiée

A la mémoire de mon Père

A ma Mère

A ma Soeur

A Monsieur le Professeur P. JOUAN

Professeur de Biochimie, Université de Rennes

Grâce à votre enseignement, vous avez su m'intéresser à la biochimie et influencer mon avenir.

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et pour avoir dirigé les recherches présentées dans cette thèse.

Je vous remercie également de me faire l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur R. MICHEL
Professeur de Biochimie, Université R. Descartes, Paris

Je vous suis très reconnaissante de vous être intéressé au travail que je présente et vous remercie de l'honneur que vous me faites en siègeant dans ce Jury.

A Monsieur le Docteur J. PASQUALINI
Maître de Recherche . C.N.R.S.

Je tiens à vous exprimer mes sentiments de gratitude pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'intérêt que vous avez porté, à différentes reprises, à mon travail.

A Monsieur le Docteur P. ROBEL
Maître de Recherche - C.N.R.S.

Vous m'avez fait l'honneur de m'avoir accordé votre parrainage scientifique auprès du C.N.R.S.. Je vous en remercie très sincèrement et je vous exprime toute ma gratitude pour avoir accepté de juger cette thèse.

A Monsieur le Professeur J. DUVAL
Professeur de Biochimie, Université de Rennes

Je vous exprime ma profonde reconnaissance pour avoir bien voulu accepter de participer au Jury de cette thèse.

A Mademoiselle le Docteur S. SAMPEREZ
Chargée de Recherche - C.N.R.S.

Je vous remercie de l'aide efficace et de l'intérêt constant que vous avez apportées à la réalisation de ce travail. Je vous suis très reconnaissante de bien vouloir le juger.

A Monsieur le Professeur ALLEGRET

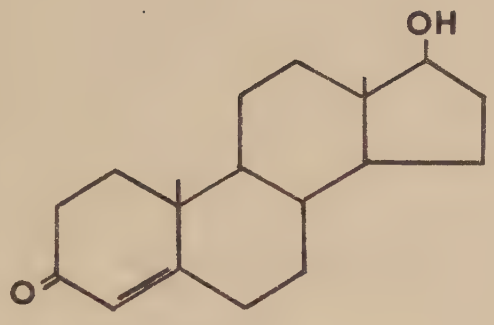
A Monsieur le Professeur CHAMBON

Qu'ils soient remerciés pour l'aide qu'ils m'ont apportée en réalisant des préparations de microscopie optique et électronique.

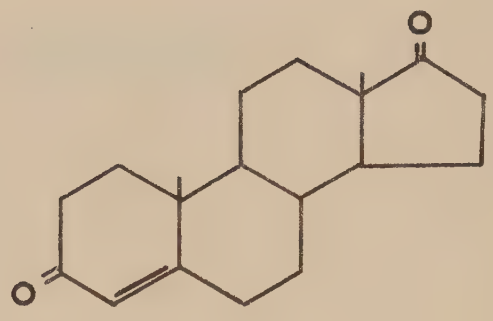
A mes camarades du Laboratoire

J'adresse mes remerciements pour la sympathie et l'aide que j'ai trouvé auprès d'eux.

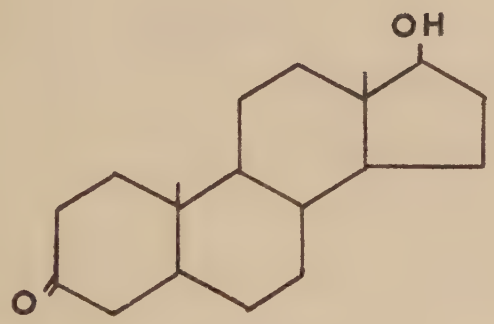
Structure chimique de la testostérone et de ses dérivés.



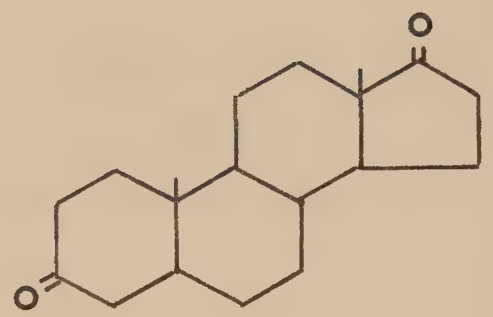
Testostérone



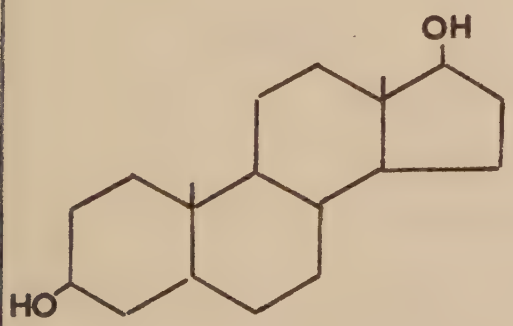
Androstènedione



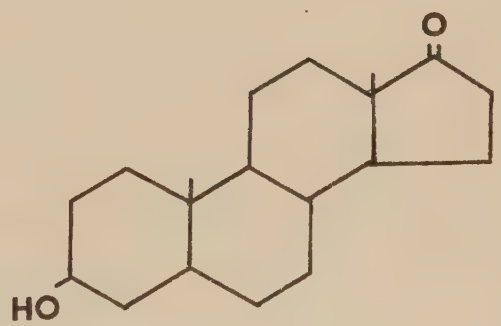
Dihydrotestosterone



Androstanedione



Androstanediol



Androstérone

TABLE des MATIERES

PAGES

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE 1

Etude de la pénétration de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau du rat normal et castré 17

CHAPITRE 2

Etude des modalités de la pénétration de la testostérone-^{3}H dans des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral du rat normal et castré 52

CHAPITRE 3

Mise en évidence d'associations macromoléculaires des androgènes dans le cytoplasme de l'hypophyse antérieure du rat mâle. Etude de leur spécificité 98

CHAPITRE 4

Mise en évidence d'associations macromoléculaires des androgènes dans des noyaux purifiés de l'hypophyse antérieure du rat mâle. Etude du métabolisme nucléaire de la testostérone-^{3}H 200

CONCLUSIONS GENERALES 243

BIBLIOGRAPHIE 258

INTRODUCTION GENERALE

Le concept de "sécrétions internes" chez les animaux fut émis par De BORDEU dès 1775, et repris par Le GALLOIS en 1801. BERTHOLD, en 1849, apportait la démonstration expérimentale en supprimant les effets de la castration par une greffe testiculaire. A partir de cette époque, de nombreuses observations cliniques ou expérimentales, permettant d'établir une relation entre l'apparition de syndrômes cliniques et l'ablation ou l'altération de diverses glandes, précisèrent peu à peu la notion de régulation interne chez les êtres vivants. Dès 1857, l'hypothèse de "constance du milieu intérieur" avait été élaborée par Claude BERNARD mais la conception moderne de la sécrétion interne par différentes glandes est due à BROWN SEQUARD qui établissait ainsi les principes essentiels de l'endocrinologie. Cette hypothèse de régulation par une substance chimique fut confirmée au début du XXè siècle par la découverte de différentes hormones. Le premier, TAKAMINE, isola et cristallisa l'adrénaline en 1901 ; mais c'est BAYLISS et STARLING qui ont démontré le rôle d'une hormone dans la régulation d'une fonction physiologique, après avoir découvert la sécrétine en 1902. Selon ces physiologistes, l'arrivée du chyme stomacal dans le duodénum entraînait la libération dans le sang d'une substance sécrétée par la muqueuse intestinale, capable de déclencher la sécrétion pancréatique. De nombreux travaux ont confirmé ces résultats et permis de connaître la structure chimique des molécules hormonales, puis d'en étudier les effets. Actuellement, l'étude du mécanisme d'action hormonale se situe au

niveau cellulaire et moléculaire. Les recherches portent plus particulièrement sur la reconnaissance par la cellule de l'hormone, ce qui implique l'existence au moins dans la cellule cible, de molécules réceptrices de cette hormone.

Du grec "Hormeo" (j'excite), le mot "hormone" fut créé par STARLING. Une hormone peut, en effet, être définie comme une substance chimique, synthétisée par les cellules des glandes endocrines, véhiculée par voie sanguine et exerçant son action sur certains tissus ou organes.

Deux types d'hormones sexuelles peuvent être distingués. De nature stéroïdique, les unes sont sécrétées par les testicules, les autres par les ovaires. Chez le mâle, LAQUEUR a découvert le testostérone en 1935 alors que, chez la femelle, l'oestradiol a été isolé, la même année, par DOISY. Transportées par voie sanguine, ces substances vont exercer leur action sur certains tissus, "les organes cibles". Ainsi, après orchidectomie, des organes tels que la prostate, les vésicules séminales, présentent une atrophie importante. De même, après ovariectomie, on observe chez la femelle une involution de l'utérus. Ces organes, soumis à l'action directe des stéroïdes hormonaux, sont dits "hormonodépendants". On peut donc penser que, dans les cellules de ces tissus cibles, il existe des structures différenciées, capables de reconnaître l'information chimique portée par la molécule hormonale.

L'étude des récepteurs hormonaux a commencé en 1950, grâce à l'utilisation de traceurs radioactifs. Les premiers essais, effectués au moyen de molécules marquées au ^{14}C, n'avaient pas permis une étude précise (1-2). A partir de 1959, l'emploi de stéroïdes marqués au tritium, à haute activité

spécifique, a permis à GLASCOCK et HOEKSTRA (3), puis à JENSEN (4) d'étudier la pénétration et la destinée de l'oestradiol dans différents tissus afin d'élucider le mécanisme d'action de cette hormone. La pénétration et la rétention de l'oestradiol, injecté à des rattes castrées ou impubères, sont plus élevées et plus durables dans les tissus cibles (utérus, vagin) et dans l'antehypophyse que dans le foie et le muscle (4). De plus, il a été démontré que l'oestradiol n'est pas métabolisé dans les cellules cibles. Ce stéroïde a été localisé dans toutes les couches de la paroi utérine mais à une concentration plus élevée dans l'endomètre que dans le myomètre (5-6-7-8).

La répartition de l'oestradiol a été, ensuite, étudiée au niveau des différents organites ou fractions cellulaires obtenus par ultra-centrifugation d'homogénats utérins de rattes traitées à l'oestradiol. La fraction cytoplasmique contient environ 30 % de la radioactivité cellulaire et la fraction nucléaire 40 à 70 % (5-9-10-11-12-13). Ces résultats ont été confirmés par autoradiographie (11-14-15-16-17-18). Différents auteurs ont pu mettre en évidence, dans le cytosol utérin, l'existence de macromolécules liant l'oestradiol-17 β (9-10-19).

Dès 1966, TOFT et GORSKI, étudiant ce complexe présent dans le cytosol, ont déterminé, par ultracentifugation sur gradient de concentration de saccharose, son coefficient de sédimentation qui, pour eux, serait de 8,5 S (20). Des valeurs de 8 S ont été trouvées, ensuite, pour cette même association moléculaire de l'oestradiol-17 β (21-22), dissociable en un complexe 4 S en présence de KCl 0,2 M (23-24).

Différentes techniques ont permis de mesurer la quantité d'hormone

liée au récepteur 8 S (25-26-27-28-29-30-31-32-33) et donc de calculer sa constante d'affinité qui serait de l'ordre de 1×10^{10} M^{-1} (34). La spécificité de ce récepteur a été démontrée. Il lie spécifiquement l'oestradiol-17 β (34). Le nombre de sites d'association du récepteur par cellule utérine a pu être déterminé. Il est de 100.000 environ (35).

Certains auteurs ont, par la suite, étudié l'association macromoléculaire de l'oestradiol dans le noyau cellulaire, et constaté que l'hormone est liée, en majeure partie, à la chromatine (19-36-37). Ce complexe oestradiol récepteur a pu être extrait (15-38-39) et son coefficient de sédimentation sur gradient de saccharose a été déterminé. Il s'agirait d'un complexe 5 S (26-27-42) qui en l'absence de sels pourrait présenter une forme 8-9 S (24-40).

Des expériences ont aussi été réalisées *in vitro*. Après incubation d'utérus en présence d'oestradiol-^{3}H, la répartition de la radioactivité dans la cellule est identique à celle observée *in vivo*. Les complexes cytosolique 8 S et nucléaire 5 S, ont également été identifiés (11-15-18-35-38-45). Différentes expériences ont permis d'établir que la pénétration dans le noyau est un phénomène thermo-dépendant. En effet, lorsque des utérus sont incubés à une température de 2°C, 70 à 80 % de la radioactivité sont localisés dans le cytosol utérin sous forme de complexe 8 S (21-24-35-41-42-43). Si ces utérus sont ensuite incubés à 37°C, la radioactivité est surtout concentrée dans les noyaux et le complexe 5 S peut être extrait.

Les expériences réalisées *in vitro* ont également permis de montrer que le récepteur cytoplasmique est nécessaire à la formation du complexe nucléaire 5 S (24-35-45), alors que le complexe 8 S peut se former directement,

même à froid, par addition d'oestradiol-^{3}H au cytosol utérin (15-35-38-42-44).

ALBERGA et BAULIEU ont étudié récemment, dans les noyaux d'endomètre de veau, une protéine de faible poids moléculaire qui possède une très forte affinité pour l'oestradiol. Cette protéine ne nécessite pas la proétine réceptrice du cytosol. Ces auteurs ont déterminé moins de 10 sites de liaison par cellule (46-47).

Des expériences concernant la nature des complexes 8 S et 5 S ont été effectuées. Ils sont détruits par les protéases mais non par les nucléases (20-39-48). Leur nature est donc vraisemblablement protéique. Après purification du complexe cytosolique utérin 4 S stabilisé, le poids moléculaire est de 75.000 et le point isoélectrique de 6,4, alors que pour le complexe 8 S, les valeurs obtenues sont de 200.000 pour le poids moléculaire et de 5,8 pour le point isoélectrique (49).

Des travaux ont été entrepris plus récemment avec la progestérone. Les premiers résultats avaient montré une faible pénétration de l'hormone dans les tissus cibles. En effet, une sensibilisation préalable à l'oestradiol augmente la pénétration dans l'organe cible de façon considérable (50-51).

De plus, il semble que les tissus cibles puissent métaboliser la progestérone mais cette transformation n'est pas immédiate. En effet, on observe un métabolisme important seulement trois heures après l'injection de progestérone à des lapines ovariectomisées et prétraitées à l'oestradiol (52).

Certains auteurs ont étudié la répartition de la radioactivité à l'intérieur de la cellule cible. Des résultats très variables ont été obtenus (52-53-54).

L'existence de macromolécules liant spécifiquement la progestérone a été démontrée dans les fractions cytoplasmique et nucléaire de l'oviducte de poule (53-54). En présence de KCl, ces complexes nucléaire et cytoplasmique ont un même coefficient de sédimentation 4 S (53-54). D'autre part, après addition directe de progestérone au cytosol, le complexe formé présente des constantes de sédimentation 8 S et 5 S (53-55-56).

BAULIEU et MILGROM ont identifié une protéine différente de celle du cytosol de l'oviducte de poule. Cette protéine qui semble être identique à la transcortine lie spécifiquement la progestérone dans le cytosol d'utérus de rate castrée prétraitée aux oestrogènes (59).

La spécificité de la progestérone a été démontrée par plusieurs auteurs (52-57-58). La constante de dissociation du complexe du cytosol serait de 5 ou 8 x 10^{-10} M (57-58-60).

Comme pour l'oestradiol, certains auteurs ont montré, *in vitro*, que le cytosol du tissu cible est nécessaire à la formation du complexe nucléaire de la progestérone (54). D'autre part, ils ont établi que la liaison de la progestérone à la chromatine est un phénomène thermo-dépendant (54). D'autres expériences, effectuées *in vitro*, ont permis à O'MALLEY (56-60) de prouver que la progestérone nucléaire est liée aux protéines acides de la chromatine, et non au DNA ou aux histones.

Des travaux, utilisant les mêmes techniques, ont été effectués sur les récepteurs des androgènes. Après perfusion intra-veineuse d'androstènedione-^{3}H, au rat mâle adulte, PEARLMAN et PEARLMAN observent une concentration plus élevée de la radioactivité dans le système génital que dans le plasma ou le muscle (61). Des résultats semblables sont obtenus avec la prostate et les vésicules séminales de rats mâles castrés, après injection de testostérone radioactive (62-63-64-65-66).

Etudiant la distribution tissulaire de l'hormone, après injection à des rats castrés, TVETER trouve la majeure partie de la radioactivité dans la fraction nucléaire (67) alors que BRUCHOWSKY établit un rapport 3/1 entre le cytoplasme et les noyaux de la prostate (68).

Contrairement à l'oestradiol qui n'est pas transformé dans la cellule cible, la testostérone subit un métabolisme rapide et multiple. Trois composés ont été principalement identifiés : l'androstane, 17-hydroxy, 3-one (androstanolone) et les 3 α et 3 β-androstanediols (69). Ces résultats ont été obtenus *in vivo* (68), *in vitro* (70), en culture organotypique (71). Pour BRUCHOWSKY et WILSON (72), ANDERSON et LIAO (70), l'androstanolone (D.H.T.) serait le stéroïde actif au niveau de la prostate ventrale. Plusieurs auteurs ont démontré que ce stéroïde est l'un des plus puissants androgènes connus (73-74). Il est concentré préférentiellement dans les noyaux des organes cibles (68-72-75-76).

Le cytosol de prostate renferme une macromomécule liant la dihydrotestostérone (77-78-79). Par ultracentrifugation sur gradient de concentration

de saccharose, ce complexe sédimente avec une valeur de 8-9 S. Il est thermolabile et de nature protéique (77-79-80). Des valeurs de 3,5-4,5 S ont également été obtenues (64-77). La constante d'association de ce complexe spécifique pour la dihydrotestostérone est de l'ordre de 10^{10} M^{-1} (80). Le récepteur 8 S peut également lier la testostérone mais pas les androstanediols (80).

Pour LIAO et FANG, le complexe 3,5 S du cytosol de prostate peut lier spontanément la dihydrotestostérone à 0°C (64). Des résultats semblables avaient été obtenus par TOFT et GORSKI pour l'oestradiol-17 β et le cytosol utérin (20). Par contre TVETER n'obtient pas de formation du complexe macromoléculaire de la testostérone après incubation du cytosol de prostate à 0°C (83).

Le coefficient de sédimentation du complexe nucléaire de la prostate ventrale a été également déterminé. La valeur obtenue est de 3 S (64). BRUCHOWSKY a défini une constante d'association qui serait de $3,5 \times 10^{7}$ M^{-1} dans le cas de la prostate (81). Selon BAULIEU et ROBEL, le récepteur nucléaire 3 S disparaît 5 à 7 jours après la castration (82).

FANG et LIAO ont étudié le passage du récepteur cytoplasmique dans les noyaux de la prostate. Ils avaient précédemment montré qu'il existait deux complexes dans le cytosol de prostate de rat. Un seul est nécessaire à la formation du complexe nucléaire (64-84).

Plusieurs auteurs ont étudié la nature du récepteur nucléaire. Pour certains, la liaison de la D.H.T. dans les noyaux de prostate se fait avec une protéine acide (72-76) ; pour d'autres, avec le D N A (85).

L'ensemble de ces résultats, acquis au cours des dix dernières années sur les différentes hormones sexuelles, a permis une meilleure compréhension de l'action initiale de l'hormone dans la cellule cible. Cette action se manifeste par une association spécifique entre la molécule hormonale et les molécules réceptrices localisées au sein de la cellule cible. Le complexe hormone-récepteur nucléaire exercerait, ensuite, son influence au niveau du génôme, induisant ainsi la réponse de la cellule ou des tissus à l'hormone.

Différentes théories, permettant d'expliquer le mécanisme d'action cellulaire des hormones ont été peu à peu élaborées. L'hypothèse la plus ancienne expliquait l'action hormonale par des modifications de la perméabilité des membranes cellulaires. Une autre théorie reposait sur une analogie avec les vitamines dont on venait de découvrir qu'elles étaient les constituants des coenzymes. Dans ce cas, l'hormone agirait par activation de certains systèmes enzymatiques (86-87).

En 1963, KARLSON propose une nouvelle théorie du mécanisme d'action hormonale, à la suite de travaux réalisés avec l'ecdysone, hormone stéroïde responsable de la mue des insectes (88). L'injection d'ecdysone provoque la formation de "bouffées chromosomiques" dans les cellules des glandes salivaires de certains insectes. Dans ce cas, l'hormone intervient en déclenchant, au niveau du chromosone, un ensemble de réactions biochimiques conduisant à la synthèse de protéines spécifiques. D'autres hormones stéroïdes pourraient avoir un mécanisme d'action similaire à celui de l'ecdysone. Dans ce cas, leur site d'action serait le génôme de l'organe cible.

Cette théorie "Hormone-gêne" semble être confirmée par les travaux effectués au cours de ces dix dernières années sur les hormones stéroïdes. Celles-ci agiraient sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines spécifiques. Ce mécanisme correspondrait, notamment, aux hormones agissant sur la croissance ou la différenciation cellulaire.

JENSEN a formulé, pour les oestrogènes et également la progestérone, une hypothèse d'action basée sur le concept de KARLSON (35-89). Ces hormones interviennent au niveau de leur tissu cible selon un mécanisme "two-step". L'hormone se lie à une protéine réceptrice cytoplasmique, caractéristique des tissus soumis à son action. Par un processus thermo-dépendant, ce complexe stéroïde-récepteur est transporté dans le noyau de la cellule où il s'associe avec une molécule réceptrice spécifique. Le complexe hormone-récepteur nucléaire accélèrerait ensuite certains processus de biosynthèse nucléaire.

Il semble bien qu'il n'y ait pas un mécanisme d'action unique pour toutes les hormones (89). Après plusieurs années de recherches, SUTHERLAND énonce, en 1965, la théorie du "Second Messager" (90), élaborée à partir des travaux portant sur l'action de l'adrénaline, du glucagon et de l'hormone adrénocorticotrope (91). L'hormone, premier messager, provoque au niveau de la membrane de la cellule cible, l'activation de l'adényl cyclase (92) qui suscite la formation d'A M P cyclique. Ce dernier, appelé second messager, modifie ensuite l'activité de certains enzymes, la synthèse d'acides nucléiques et la libération de polypeptides ribosomiques. Cet ensemble de réactions traduirait la réponse physiologique de la cellule à l'impact hormonal. Ces effets interviennent, notamment, après stimulation, par l'intermédiaire de l'A M P cyclique de proceesus biochimiques de la glycogénolyse ou de la lypolyse.

Les mécanismes de l'action des hormones sexuelles ont été particulièrement étudiés dans les tissus ou organes cibles, directement soumis à l'influence hormonale, mais la plupart des processus hormonaux sont soumis à une régulation par des organes centraux de l'hormonogénèse, tels que l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure.

L'hypothalamus est une partie du diencéphale, limité par le chiasma optique au niveau du plancher encéphalique, la commissure antérieure à la partie supérieure, en avant par la lame terminale, en arrière par le sulcus hypothalamique. Il est constitué par de la substance grise à l'intérieur de laquelle des éléments neuroniques nombreux constituent les "noyaux" diencéphaliques. L'hypothalamus est relié à la tige pituitaire par une zone appelée "éminence médiane". La tige pituitaire permet la connection entre l'hypothalamus et l'hypophyse, située dans la fosse hypophysaire de l'os sphénoïde. Cette glande est constituée de 3 parties : un lobe antérieur glandulaire encore appelé pars antérior, un lobe postérieur ou nerveux et un lobe intermédiaire la pars intermédia, généralement peu développé. La neurohypophyse est reliée à l'hypothalamus par un grand nombre de fibres nerveuses, contrairement à l'ante - hypophyse. Cependant, il existe, au niveau de l'éminence médiane, un réseau très développé de capillaires, formant le plexus primaire. Ces capillaires sont en contact avec les terminaisons nerveuses hypothalamiques. L'antehypophyse est irriguée par un autre système de capillaires constituant le plexus secondaire de ce système porte, décrit par HARRIS et GREEN (93). De plus, l'écoulement sanguin se fait du plexus primaire vers la tige pituitaire.

Du point de vue embryologique, les lobes de l'hypophyse ont une origine très différente puisque l'ante -hypophyse est issue d'une invagination de l'épiblaste du stomodaeum, la poche de Rathke, alors que la post-hypophyse n'est qu'un prolongement nerveux de l'hypothalamus.

Le lobe antérieur de l'hypophyse a une structure histologique complexe. Le premier, en 1892, SCHÖNEMANN (94) montre qu'il renferme différents types cellulaires que THOM différenciera en cellules acidophiles et basophiles (95), BENDA, à la même époque, découvre des cellules chromophobes (96). Dans sa célèbre classification, ROMEIS, en 1940, distingue deux types de cellules acidophiles et trois types de cellules basophiles (97). Des progrès dans les techniques de coloration et l'utilisation de la microscopie électronique ont permis à HERLANT (98) et plus récemment à EZRIN et MURRAY (99) d'identifier six types cellulaires différents dans la partie antérieure de l'hypophyse.

Cette glande sécrète différentes hormones trophiques, dont l'adrénocorticotrophic hormone (A.C.T.H.), la thyroid stimulating hormone (T.S.H.), la somatotrophic hormone (S.T.H.) ou growth hormone (G.H.), la luteinizing hormone (L.H.), la follicle stimulating hormone (F.S.H.). L'identification des cellules sécrétant ces hormones a été longue et difficile. Une étude des granules de sécrétion, observées dans ces cellules, a montré un rapport entre les caractères histochimiques des grains de sécrétions contenant les hormones associées à des protéines et la composition chimique des hormones élaborées par ces cellules. FARQUHAR décèle chez le rat un type cellulaire lié à l'activité adrénocorticotrope de l'hypophyse (100). PURVES pense qu'il existe, chez cet animal, deux types de cellules gonadotropes, les unes secrétant la F.S.H., les autres la L.H. hypophysaire.(101). L'existence de ces cellules gonadotropes

est confirmée par l'augmentation du nombre de certaines cellules basophiles de l'ante.-hypophyse après un temps de castration de une à deux semaines.

Un certain nombre d'observations cliniques ou expérimentales ont suggéré que la sécrétion des hormones hypophysaires est sous le contrôle du cerveau et plus particulièrement de l'hypothalamus. Pour ERDHEIM, en 1909, l'obésité et l'hypogonadisme qui accompagnent le syndrôme de FRÖLICH sont liés à une atteinte cérébrale (102). Des expériences de section de la tige pituitaire, de transplantation de l'hypophyse ou de lésions hypothalamiques montrent le rôle joué par l'hypothalamus sur les secrétions hypophysaires. Elles ont conduit à la recherche de médiateurs hypothalamiques agissant sur la libération des hormones hypophysaires. Ceux-ci ont été décrits sous le nom de "Releasing Factors" (R.F.). En ce qui concerne le contrôle de la fonction gonadotrope hypophysaire, un L.H-R.F. a été identifié, puis isolé (103, 104-105). Ces releasing factors, vraisemblablement synthétisés dans des neurones de l'hypothalamus, passent dans la circulation porte et sont ainsi véhiculés jusqu'à la partie antérieure de l'hypophyse.

Sous l'action des R.F. hypothalamiques, l'ante -hypophyse libère des hormones dans la circulation générale. Les gonadotrophines, (L.H et F.S.H) ainsi excrétées, vont exercer leur action trophique sur les organes sexuels. Chez la femelle, l'action de la F.S.H., provoque la sécrétion d'oestrogènes alors que la L.H. accroît celle de la progestérone. Chez le mâle, la L.H. entraîne le développement du tissu interstitiel du testicule, responsable de la sécrétion de la testostérone, alors que la F.S.H. produit une augmentation

de la taille des testicules. Les stéroïdes hormonaux, ainsi libérés, passent dans la circulation sanguine.

En 1932, MOORE et PRICE montrent que les hormones sexuelles ralentissent l'activité gonadotrope de l'hypophyse, postulant une régulation par feed-back (106). Cette action rétroactive freinatrice des stéroïdes hormonaux sur l'axe hypothalamo-hypophysaire est prouvée par différentes observations. La gonadectomie entraîne une augmentation de la taille de l'hypophyse, du taux plasmatique de la F.S.H. et surtout de la L.H., La concentration sanguine en hormone sexuelle serait un facteur d'équilibre.

Il existe, d'autre part, un feed-back court de la L.H. sur l'hypothalamus qui peut s'effectuer via la circulation ou par un drainage de l'hypophyse à l'hypothalamus.

Des travaux ont montré l'existence de récepteurs, cytoplasmiques et nucléaires, des hormones sexuelles dans les cellules des tissus cibles, soumis à l'action de ces hormones. Certains auteurs ont pensé qu'il pouvait exister également des récepteurs hormonaux au niveau des organes de régulation. Ils ont étudié la pénétration et la rétention de l'oestradiol-17 β tritié dans l'hypophyse, l'hypothalamus et certaines régions du cerveau.(107-108-109). Ils ont constaté une forte affinité de l'hypophyse antérieure pour cette hormone et une accumulation préférentielle de l'hormone dans les aires préoptiques et le noyau arqué de l'hypothalamus (110). Ces résultats ont été confirmés par autoradiographie. En effet, l'oestradiol-17 β est concentré dans les cellules acidophiles, basophiles et chromophobes de l'hypophyse antérieure(111-112-113)

et dans certains neurones hypothalamiques (112-114-115).

Des protéines cytoplasmiques et nucléaires liant l'oestradiol-17 β ont été trouvées dans l'hypophyse antérieure (116-117-118). Des coefficients de sédimentation sur gradient de saccharose, d'une valeur de 4,5-8 S ont été déterminés pour le complexe cytoplasmique hypophysaire (119-120). Les complexes nucléaires hypophysaires et hypothalamiques auraient un coefficient de sédimentation de 6-7 S (119-121).

D'autre part, il semble que l'oestradiol ne soit pas métabolisé dans l'hypophyse antérieure.

Les premiers travaux concernant l'action de l'oestradiol sur les centres de régulation ont été effectués en 1967. A cette même époque, nous avons commencé à étudier le mode de pénétration de la testostérone tritiée au niveau de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus. Il nous a paru intéressant de rechercher la présence d'associations macromoléculaires des androgènes dans les organes de régulation. Cette étude pourrait contribuer à élucider les processus de l'activité hormonale sur les organes de régulation de l'hormonogénèse. Ces mécanismes d'action pourraient s'exercer selon un mécanisme semblable à celui proposé par JENSEN pour les organes cibles : après avoir pénétré dans la cellule, l'hormone s'associe à un récepteur cytoplasmique. Ce complexe est transporté dans le noyau de la cellule où l'hormone se lie à un récepteur nucléaire spécifique, capable d'activer certains processus biochimiques, produisant les réponses hormonales spécifiques.

Les travaux que nous avons entrepris ont, donc, porté sur les modalités de pénétration et de captation de l'hormone mâle au niveau de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus du rat normal et castré, sur la recherche d'associations macromoléculaires de cette hormone dans le cytoplasme et les noyaux de ces organes, et sur l'étude du métabolisme cellulaire de la testostérone dans ces centres de régulation de l'hormonogénèse. Ces recherches ont pour but de préciser le mécanisme d'action, à l'échelon cellulaire, de l'hormone mâle et de contribuer ainsi à une meilleure compréhension de son rôle dans la régulation de la synthèse des gonadostimulines hypophysaires.

CHAPITRE 1

ETUDE DE LA PENETRATION DE LA TESTOSTERONE-^{3}H DANS L'HYPOPHYSE ANTERIEURE, L'HYPOTHALAMUS ET LE CERVEAU DU RAT NORMAL ET CASTRE

S O M M A I R E

I - PROCESSUS EXPERIMENTAL

1 - Animaux

2 - Testostérone-1,2-^{3}H

3 - Prélèvement des organes

4 - Extraction de la radioactivité tissulaire

5 - Mesure de la radioactivité

6 - Expression des résultats

II - RESULTATS

1 - Captation de la testostérone-1,2-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau de rats normaux

2 - Captation de la testostérone-1,2-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau de rats castrés

a) Rats adultes castrés depuis 15 jours

α) Pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H après son injection intra-péritonéale

β) Pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H après son injection sous-cutanée

b) Rats adultes castrés depuis 1 mois

c) Rats adultes castrés depuis 2 mois

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS.

INTRODUCTION

Dans l'organisme, les hormones sexuelles exercent une action trophique sur la croissance et le développement de certains tissus. Ces organes cibles, hormono-dépendants, sont directement soumis aux taux d'hormone circulant. Chez le mâle, la prostate s'atrophie après castration, mais l'équilibre peut être rétabli par l'injection d'androgènes. Un mécanisme semblable est démontré, chez la femelle, dans l'utérus, organe cible de l'oestradiol. JENSEN et JACOBSON ont montré une différence importante entre les tissus hormono-dépendants et les tissus non-cibles (4). Ces auteurs ont injecté, par voie sous-cutanée, des doses physiologiques d'oestradiol-^{3}H à des rates immatures et examiné la concentration de la radioactivité dans différents tissus. Les organes sensibles aux oestrogènes, tels que l'utérus, le vagin, l'hypophyse antérieure, captent et retiennent, d'une façon caractéristique, l'oestradiol injecté. Le maximum d'incorporation de la radioactivité est atteint une à deux heures après l'injection de l'hormone. De plus, ces tissus retiennent l'oestradiol-^{3}H à un taux élevé pendant une période de six heures. Par contre, les tissus non cibles tels que l'hypotalamus, le cerveau, le foie ou le muscle, présentent un modèle différent d'incorporation de la radioactivité. Le maximum de radioactivité dans ces organes est obtenu 15 minutes après l'injection de l'oestradiol-^{3}H. La décroissance est ensuite très rapide (4).

Le but de nos recherches est de savoir si l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus, sièges de la régulation de l'hormonogénèse par l'intermédiaire du mécanisme du feed-back, peuvent être considérés comme des organes cibles. Il est d'abord nécessaire de savoir comment la testostérone atteint les organes étudiés, combien de temps elle y exerce son action, c'est-à-dire la durée de sa rétention. Nous avons administré, par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale, la testostérone-1,2-^{3}H à des rats adultes ou orchidectomisés et comparé la pénétration et la rétention de l'androgène dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cortex cérébral et le sérum sanguin. Ces travaux ont été entrepris afin de nous permettre d'évaluer la réceptivité de ces organes vis-à-vis de la testostérone.

I - PROCESSUS EXPERIMENTAL

1 - Animaux

Nous avons utilisé, pour toutes nos expériences, des rats mâles de souche "Wistar" CF, provenant de l'élevage Janvier (53 - Le Genest). Ces animaux, élevés à la température constante de 22°C, ont nourriture (aliments granulés U.A.R.) et eau à volonté. La durée d'illumination de l'animalerie est de 12 heures par jour.

Des lots de 12 rats normaux, d'un poids moyen de 275 g à 300 g chacun,ont été constitués. Au cours des études faites chez le rat castré, des lots de 5 rats, d'un poids moyen de 250 g, ont été orchidectomisés par voie péritonéale, sous anesthésie à l'éther éthylique. Ils ont été sacrifiés 15, 30 ou 60 jours après l'ablation des testicules.

2 - Testostérone-1,2-^{3}H

La testostérone-1,2-^{3}H est fournie par le C.E.N..Lors des premières livraisons, l'activité spécifique était de 5,6 Ci/mM. La testostérone tritiée fournie par la suite avait une activité spécifique de 46 Ci/mM. La solution initiale benzène-méthanol (9/1) est évaporée à sec sous vide. Le résidu sec est dissous dans 5 ml d'alcool éthylique absolu. Cette solution-mère alcoolique est ensuite diluée avec du sérum physiologique. Chaque animal

reçoit 0,2 µg d'hormone représentant une activité de 4 ou 31 µCi selon l'activité spécifique de la testostérone tritiée. L'administration de l'androgène est faite par voie intra-péritonéale (I.P.) ou sous-cutanée (S.C.) à la racine de la cuisse.

3 - Prélèvement des organes

Les rats sont sacrifiés par décapitation 5, 15, 30, 60, 120 ou 180 minutes après l'injection de testostérone-^{3}H. Les organes sont prélevés et pesés le plus rapidement possible à l'aide d'une balance Mettler type H 16. Ils sont conservés à 0°C pendant toute la durée des opérations d'ablation. Sur chaque animal, on prélève l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, la partie antérieure du lobe frontal du cerveau et dans certains cas le cervelet. Le sang des animaux est recueilli sans anticoagulant.

4 - Extraction de la radioactivité tissulaire

Les tissus sont broyés à 0°C, au moyen d'un homogénéiseur de type Potter, avec piston en téflon, dans un mélange à parties égales d'éthanol absolu et d'éther éthylique. Les ante-hypophyses sont homogénéisées, pendant 3 à 5 minutes, dans 5 ml du mélange alcool-éther. Après décantation, le surnageant est filtré et recueilli dans une fiole de comptage. L'homogénéiseur de Potter est rincé 2 fois par 2,5 ml du mélange d'extraction.

Les hypothalamus, les fragments de cerveau et de cervelet sont broyés dans 10 ml du mélange éthéro-alcoolique. Les extraits sont filtrés et les Potters rincés 2 fois par 5 ml d'alcool-éther. Pour tous les organes, les liquides d'extraction réunis sont évaporés à sec, sous vide, dans les fioles de comptage.

Le sang recueilli est laissé quelques heures à froid. Après coagulation, le sérum est séparé par centrifugation. On extrait la radioactivité en traitant 1 ml du sérum obtenu par 10 ml d'un mélange éthanol-éther (v/v). Après centrifugation, la fraction éthéro-alcoolique est évaporée sous vide.

5 - Mesure de la radioactivité

Les extraits secs sont repris par 0,2 à 0,5 ml d'hydroxyde de Hyamine ([p.diisobutyl-cresoxyethyl diméthyl] benzyl ammonium hydroxyde) et additionnés de 10 ml de toluène scintillant dont la composition est la suivante : P.P.O. ..... 4 g, (2,5 diphényl-oxazol), D.M. POPOP .... 0,5 g, (1,4 bis [2-(4-méthyl-5 phényloxazolyl)]-benzène, toluène q.s.p. 1000 ml. Les mesures sont effectuées au moyen d'un compteur à scintillation liquide Mark I (Nuclear Chicago). La correction de quenching est faite selon la méthode du rapport des canaux avec standard externe. Le rendement est voisin de 30 %.

6 - Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en moles de testostérone fixées pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum. En outre, nous avons utilisé le mode de représentation décrit par KATO : la rétention des androgènes dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus est exprimée en comparant la radioactivité captée par ces organes à celle du cortex cérébral ou du sérum considérée comme égale à l'unité.

Les déviations standard sont calculées selon la formule :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\varepsilon d^2}{N(N-1)}}$$

II - RESULTATS

1 - Captation de la testostérone-1,2-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau de rats normaux

Après injection intra-péritonéale de 0,2 µg de testostérone-^{3}H à des rats normaux adultes, on constate que la pénétration de l'hormone est très rapide dans l'hypophyse antérieure et les centres nerveux supérieurs (Fig. 1). Pour tous les organes étudiés, le maximum de captation est atteint 5 minutes après l'injection de l'androgène. Il existe, cependant, des différences dans la pénétration de l'hormone dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau.

En effet, c'est l'hypophyse qui capte la testostérone le plus intensément. La décroissance est ensuite très rapide puisque, 30 minutes après l'administration de l'hormone, il y a 4 fois moins de radioactivité captée qu'en 5 minutes. La courbe de pénétration présente ensuite un plateau entre 30 et 120 minutes (Fig. 1) (Tableau I).

On constate peu de différences entre l'hypothalamus et le cerveau. Les courbes de pénétration de la testostérone-^{3}H sont presque identiques pour ces deux organes. Le taux de la radioactivité le plus élevé est obtenu 5 minutes après l'injection. La décroissance est ensuite très progressive (Fig. 1) (Tableau I).

Après une concentration importante dans les cinq minutes qui suivent l'injection, le taux de radioactivité dans le sérum décroît ensuite très régulièrement (Fig. 1, Tableau I).

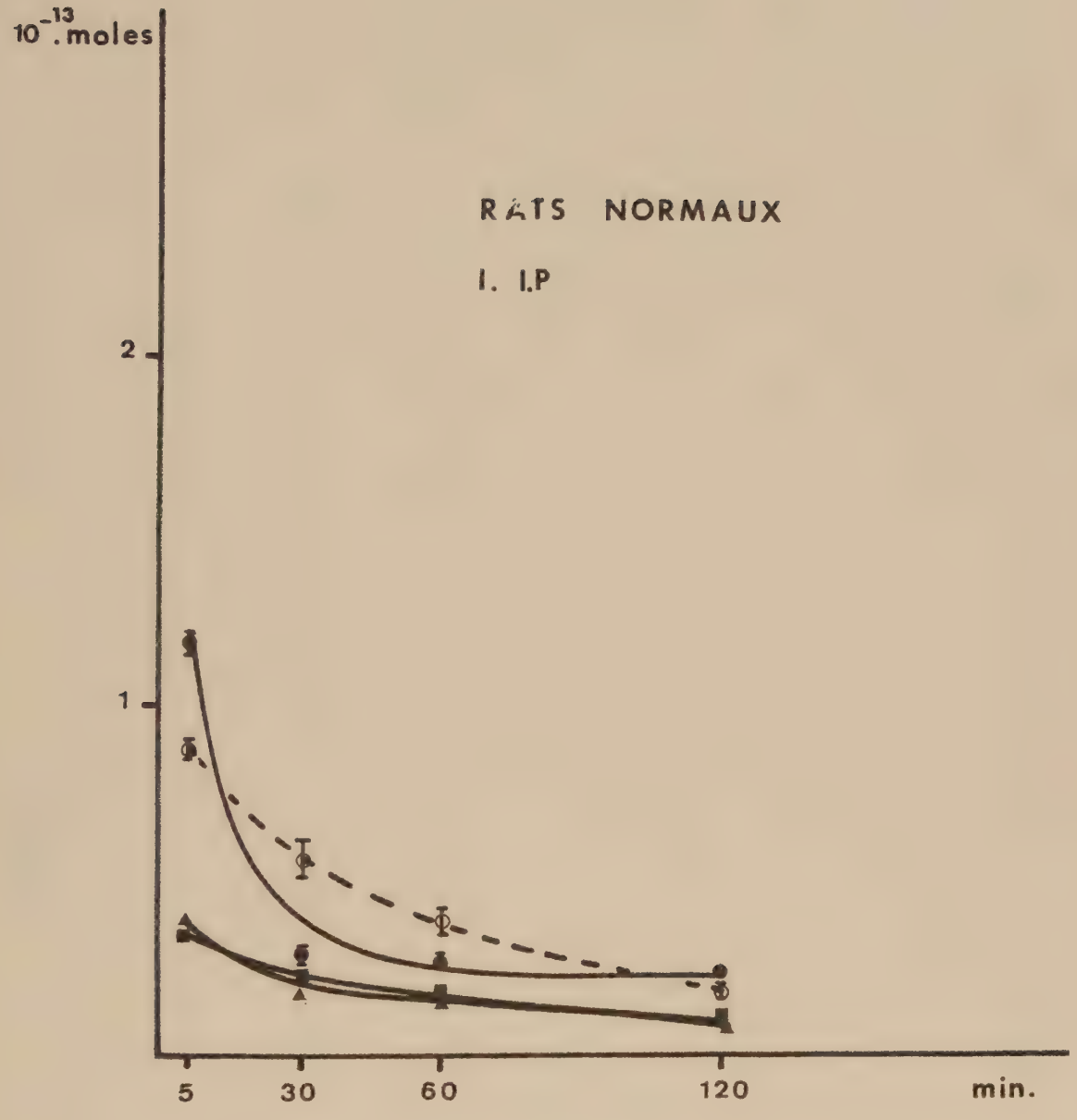


Fig. 1 - Incorporation, en fonction du temps, de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure (—●—), l'hypothalamus (—■—), le cortex cérébral (—▲—) et le sérum (--○--) de rats normaux, après injection intra-péritonéale.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.
- En abscisses, temps en minutes après l'injection de l'hormone.

TABLEAU I

Etude de la pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau et le sérum de rats normaux après son injection intra-péritonéale.

Résultats exprimés en pg de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum

et en moles de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum

	5 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes
Hypophyse antérieure	34 pg $1,18 \pm 0,03.10^{-13}$ moles	8,1 pg $0,28 \pm 0,018.10^{-13}$ moles	7,9 pg $0,27 \pm 0,015.10^{-13}$ moles	6,9 pg $0,23.10^{-13}$ moles
Hypothalamus	10 pg $0,34.10^{-13}$ moles	6,7 pg $0,23 \pm 0,012.10^{-13}$ moles	5 pg $0,17 \pm 0,012.10^{-13}$ moles	1,9 pg $0,06 \pm 0,003.10^{-13}$ moles
Cerveau	11 pg $0,38.10^{-13}$ moles	5,4 pg $0,18 \pm 0,012.10^{-13}$ moles	5,2 pg $0,18 \pm 0,018.10^{-13}$ moles	1,8 pg $0,06 \pm 0,018.10^{-13}$ moles
Sérum	25,3 pg $0,87 \pm 0,03.10^{-13}$ moles	16 pg $0,55 \pm 0,04.10^{-13}$ moles	10,9 pg $0,37 \pm 0,04.10^{-13}$ moles	5,3 pg $0,18 \pm 0,02.10^{-13}$ moles

La quantité de testostérone parvenant à l'hypophyse et aux centres nerveux est très faible. Lorsque la concentration de l'hormone est maximale, une hypophyse ne renferme que $0,07 \times 10^{-13}$ moles (2,2 pg) d'hormone après administration de 0,2 µg de testostérone tritiée ($0,69 \times 10^{-9}$ moles). Ce taux ne représente que 0,001 % de la quantité de radioactivité injectée. La quantité fixée par organe est plus importante pour l'hypothalamus que pour la glande hypophysaire. Cinq minutes après l'injection de l'hormone, on trouve $0,24 \times 10^{-13}$ moles (7 pg) de testostérone par hypothalamus, soit 0,0035 % de la quantité injectée.

Le rapport hypophyse antérieure /cortex (H.A./C), très élevé cinq minutes après l'injection de l'androgène, devient deux fois plus faible par la suite. Ce rapport H.A./C ne traduit une rétention importante de l'hormone par la glande pituitaire que 120 minutes après l'administration de la testostérone-^{3}H. (Tableau II). Quant au rapport hypothalamus/cortex (H/C), il reste constant et proche de l'unité pendant les deux heures qui suivent l'administration de l'androgène. Il semble donc qu'il n'y ait pas de rétention plus importante dans l'hypothalamus que dans le cerveau (Tableau II).

Le rapport hypophyse antérieure/sérum sanguin H.A./S. n'est supérieur à l'unité qu'aux temps 5 et 120 minutes. Ce même rapport, établi pour l'hypothalamus, reste constant pendant les 2 heures suivant l'injection de testostérone, la valeur obtenue étant à peu près égale à 0,4 (Tableau II).

TABLEAU II

Concentration de la radioactivité dans l'hypophyse antérieure (HA) et l'hypothalamus (H) de rats normaux, après injection I.P. de testostérone-1,2-^{3}H, par rapport au cortex cérébral (C) et au sérum (S) (C = 1, S = 1)

	$\frac{H}{C}$	$\frac{H}{C}$	$\frac{HA}{S}$	$\frac{H}{S}$
5 minutes	3	0,9	1,3	0,4
30 minutes	1,50	1,24	0,5	0,4
60 minutes	1,51	0,96	0,7	0,4
120 minutes	3,8	1	1,2	0,3

2 - Captation de la testostérone-1,2-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau de rats castrés

a) Rats adultes castrés depuis 15 jours

Des rats castrés depuis 15 jours ont reçu une injection de testostérone-1,2-^{3}H soit par voie intra-péritonéale, soit par voie sous-cutanée.

α) Pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H après son injection par voie intra-péritonéale

Dans tous les organes étudiés, un maximum de pénétration est observé quinze minutes après l'injection intra-péritonéale de l'androgène

(Fig. 2, tableau III). Le taux de captation par la glande pituitaire est très supérieur à celui de l'hypothalamus, du cerveau et du sérum. La pénétration dans l'hypophyse antérieure, très importante, quinze minutes après l'injection décroît ensuite très lentement. Puis plus rapidement pendant la troisième heure (Fig. 2, tableau III).

L'hypothalamus et le cerveau présentent des courbes de pénétration très voisines. Après une captation rapide, la décroissance survient dans les 30 minutes qui suivent l'injection. Puis la courbe décroît lentement La fixation d'androgène est cependant un peu plus importante pour l'hypothalamus que pour le cortex cérébral (Fig. 2).

La courbe de pénétration de la radioactivité fixée par le sérum présente un maximum 15 minutes après l'injection du stéroïde, puis un plateau entre 30 et 120 minutes (Fig. 2).

Quinze minutes après l'injection de testostérone, $0,17.10^{-13}$ moles (5 pg) d'hormone sont captées par la glande hypophysaire, ce qui représente 0,0025 % de la quantité injectée à l'animal. Trois heures plus tard, cet organe en renferme encore $0,05 \times 10^{-13}$ moles (1,6 pg), soit 0,0008 % du taux d'hormone injecté initialement.

Au moment de la pénétration maximale, un hypothalamus capte 0,005 % de la testostérone injectée au rat, ce qui équivaut à $0,34.10^{-13}$ moles (9,8 pg) d'hormone. Trois heures plus tard, ce tissu contient encore 0,0016 % de la radioactivité injectée à l'animal, soit $0,11 \times 10^{-13}$ moles (3,3 pg) d'hormone par hypothalamus.

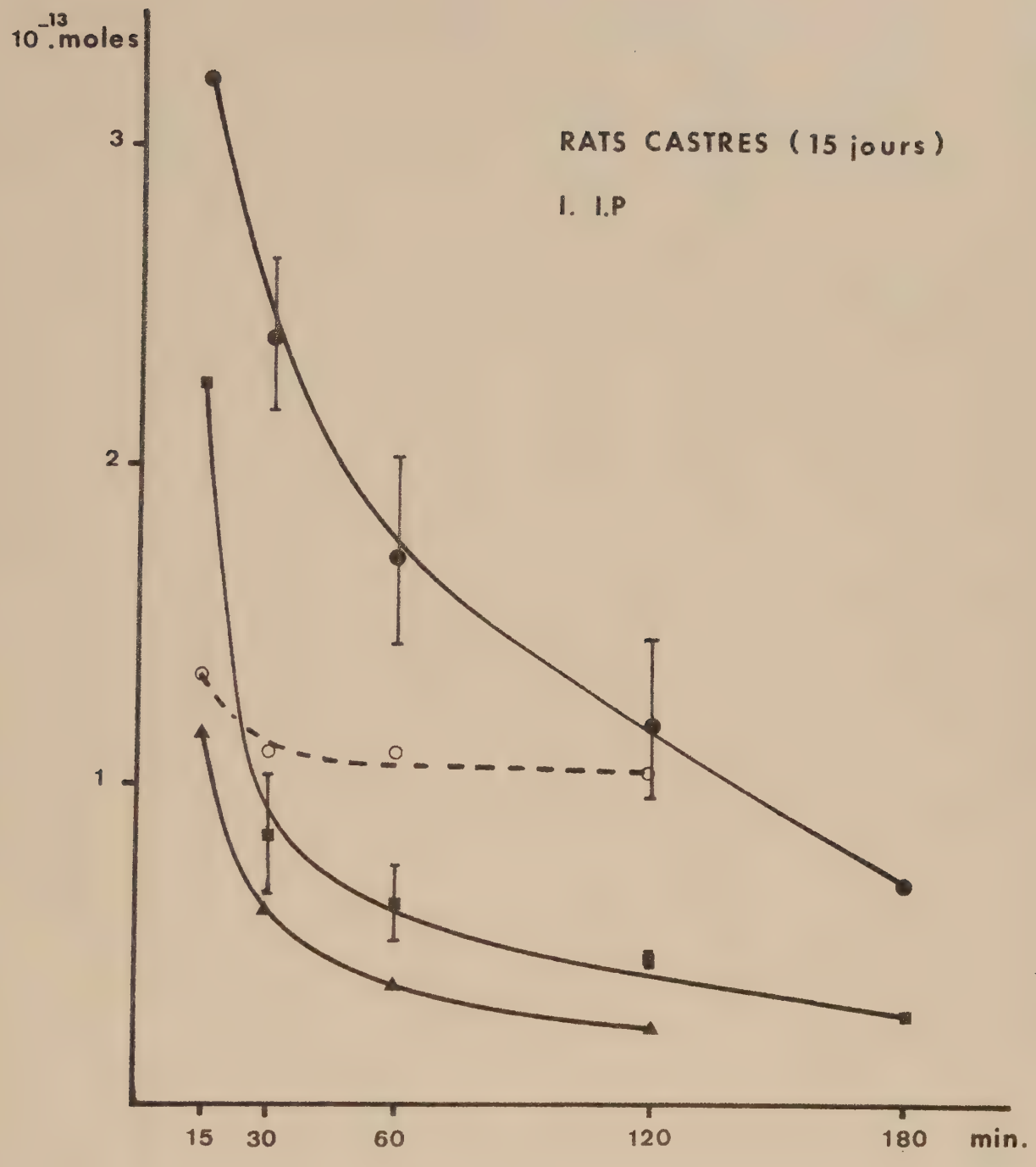


Fig. 2 - Incorporation, en fonction du temps, de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure (—●—), l'hypothalamus (—■—), le cortex cérébral (—▲—) et le sérum (--○--) de rats castrés après injection intra-péritonéale.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.
- En abscisses, temps en minutes après l'injection de l'hormone.

TABLEAU III

Etude de la pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau et le sérum de rats castrés depuis 15 jours, après injection intra-péritonéale.

Résultats exprimés en pg de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum

et en moles de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.

	15 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	92 pg $3,20.10^{-13}$ moles	69,5 pg $2,41 \pm 0,24.10^{-13}$ moles	50 pg $1,73 \pm 0,3.10^{-13}$ moles	35 pg $1,21 \pm 0,24.10^{-13}$ moles	20 pg $0,69.10^{-13}$ moles
Hypothalamus	65 pg $2,28.10^{-13}$ moles	24,5 pg $0,85 \pm 0,19.10^{-13}$ moles	18,5 pg $0,64 \pm 0,13.10^{-13}$ moles	13,5 pg $0,46 \pm 0,01.10^{-13}$ moles	7 pg $0,24.10^{-13}$ moles
Cerveau	34 pg $1,18.10^{-13}$ moles	18 pg $0,62.10^{-13}$ moles	11 pg $0,38.10^{-13}$ moles	7 pg $0,24.10^{-13}$ moles	
Sérum	40 pg $1,35.10^{-13}$ moles	32 pg $1,11.10^{-13}$ moles	32,5 pg $1,12.10^{-13}$ moles	30,7 pg $1,06.10^{-13}$ moles	

On constate une rétention importante de la radioactivité dans l'hypophyse antérieure par rapport au cortex cérébral. Quinze minutes après l'administration de la testostérone-^{3}H, le rapport H.A./C est égal à 2,7 et croît régulièrement pour atteindre une valeur de 5 après 120 minutes (tableau IV). L'hypothalamus montre également une rétention par rapport au cerveau mais elle est plus faible que celle obtenue avec l'hypophyse antérieure (Tableau IV).

Le rapport H.A./S atteint des valeurs égales à 2,3 au temps initial et reste supérieur à l'unité pendant les deux heures qui suivent l'injection. Quant au rapport H/S, il décroît régulièrement et est inférieur à 1.

TABLEAU IV

Concentrations de la radioactivité dans l'hypophyse antérieure (H.A.) et l'hypothalamus (H) de rats castrés depuis 15 jours, après injection I.P. de testostérone-1,2-^{3}H, par rapport au cortex cérébral (C) et au sérum (S). (C = 1, S = 1).

	$\frac{H.A}{C}$	$\frac{H}{C}$	$\frac{H.A}{S}$	$\frac{H}{S}$
15 minutes	2,7	1,9	2,3	1,6
30 minutes	3,8	1,3	2,1	0,76
60 minutes	4,5	1,6	1,5	0,56
120 minutes	5	1,9	1,1	0,43

β) Pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H après son injection par voie sous-cutanée

La pénétration de la testostérone-^{3}H injectée par voie sous-cutanée est rapide pour tous les organes étudiés. Le maximum de pénétration est obtenu 5 minutes après l'injection de l'androgène dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau, le cervelet et le sérum (Fig.3). La décroissance est faible et régulière pour la glande hypophysaire et le sérum (Tableau V). Par contre, elle est rapide et importante pour l'hypothalamus, le cerveau et le cervelet. Les courbes de pénétration présentant une même allure pour ces 3 organes (Fig. 3). Elles ne sont pas différenciables entre le cerveau et le cervelet.

Dans une hypophyse antérieure, il pénètre $0,14 \times 10^{-13}$ moles (4,2 pg) de testostérone 15 minutes après son injection par voie sous-cutanée. Ceci représente 0,002 % de la dose administrée à l'animal. Après 3 heures, il reste $0,06 \times 10^{-13}$ moles (1,8 pg) d'hormone par glande.

Quinze minutes après l'injection de testostérone-^{3}H, l'hypothalamus renferme $0,34 \times 10^{-13}$ moles (10 pg) de testostérone, soit 0,005 % du taux injecté. Trois heures après l'injection, 0,0016 % de l'hormone administrée initialement sont encore détectables dans le tissu hypothalamique, ce qui représente $0,11 \times 10^{-13}$ moles (3,2 pg) de testostérone par hypothalamus.

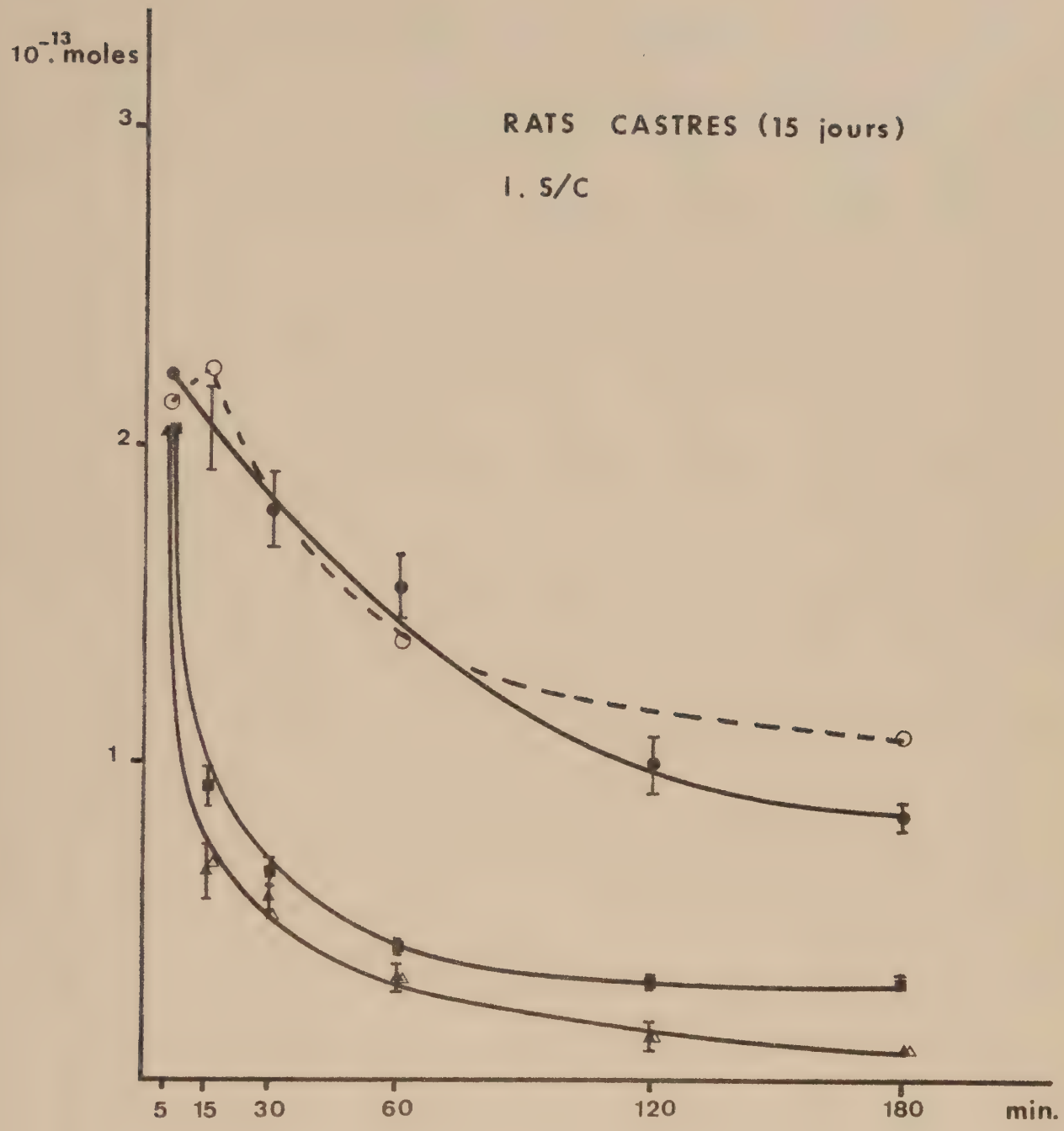


Fig. 3 - Incorporation, en fonction du temps, de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure (—●—), l'hypothalamus (—■—), le cortex cérébral (—▲—), le cervelet (—△—) et le sérum (- -○- -) de rats castrés, après injection sous-cutanée (s/c).

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.
- En abscisses, temps en minutes après l'injection de l'hormone.

TABLEAU V

Etude de la pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau, le cervelet et le sérum de rats castrés depuis 15 jours, après son injection sous-cutanée.

Résultats exprimés en pg d'hormone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum

et en moles d'hormone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.

	5 minutes	15 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	64 pg $2,22.10^{-13}$ m	59,6 pg $2,07 \pm 0,12.10^{-13}$ m	52 pg $1,80 \pm 0,12.10^{-13}$ m	45 pg $1,56 \pm 0,1.10^{-13}$ m	30 pg $1,0 \pm 0,09.10^{-13}$ m	24,6 pg $0,85 \pm 0,05.10^{-13}$ m
Hypo-thalamus	59 pg $2,04.10^{-13}$ m	27 pg $0,93 \pm 0,06.10^{-13}$ m	18,7 pg $0,65 \pm 0,04.10^{-13}$ m	12,3 pg $0,42 \pm 0,02.10^{-13}$ m	9,5 pg $0,32 \pm 0,015.10^{-13}$ m	9,5 pg $0,32 \pm 0,015.10^{-13}$ m
Cerveau	60 pg $2,08.10^{-13}$ m	19 pg $0,65 \pm 0,09.10^{-13}$ m	16,5 pg $0,57 \pm 0,04.10^{-13}$ m	9,5 pg $0,32 \pm 0,04.10^{-13}$ m	4 pg $0,13 \pm 0,04.10^{-13}$ m	3 pg $0,10.10^{-13}$ m
Cervelet		20 pg $0,69.10^{-13}$ m	15 pg $0,52.10^{-13}$ m	10 pg $0,34.10^{-13}$ m	4 pg $0,13.10^{-13}$ m	3 pg $0,10.10^{-13}$ m
Sérum	61 pg $2,11.10^{-13}$ m	63,8 pg $2,22.10^{-13}$ m	54,2 pg $1,88.10^{-13}$ m	40 pg $1,38.10^{-13}$ m		31,7 pg $1,10.10^{-13}$ m

Le rapport H.A./C, égal à l'unité 5 minutes après l'injection du stéroïde, augmente de 8 fois trois heures plus tard. Les valeurs obtenues pour le rapport H/C sont plus faibles (Tableau VI). L'augmentation est seulement égale à 3 après un temps d'attente de 180 minutes.

Le rapport H.A./S est constant et proche de l'unité pendant toute la période étudiée tandis que le rapport H/S décroît régulièrement (Tableau VI).

TABLEAU VI

Concentration de la radioactivité dans l'hypophyse antérieure (H.A) et l'hypothalamus (H) de rats castrés depuis 15 jours, après injection sous-cutanée de testostérone-1,2-^{3}H, par rapport au cortex cérébral (C) et au sérum (S). (C = 1, S = 1).

	$\frac{H.A}{C}$	$\frac{H}{C}$	$\frac{H.A}{S}$	$\frac{H}{S}$
5 minutes	1	0,98	1	0,96
15 minutes	3,1	1,4	0,93	0,42
30 minutes	3,1	1,1	0,95	0,3
60 minutes	4,7	1,2	1,1	0,3
120 minutes	7,5	2,3		
180 minutes	8,2	3,1	0,7	0,29

b) Rats adultes castrés depuis 1 mois

Une étude de la captation de la testostérone-1,2-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau et le sérum de rats castrés depuis 1 mois a été entreprise après son administration par voie sous-cutanée.

Pour l'hypophyse antérieure, la pénétration est optimale entre 15 et 30 minutes après l'injection de l'hormone (Tableau VII, Figure 4). La courbe décroît régulièrement. On observe un plateau entre 120 et 180 minutes (Tableau VII, Figure 4). Nous n'avons pas pu obtenir de résultats reproductibles pour l'hypothalamus et le cerveau au cours de cette expérience.

Quinze et trente minutes après l'injection, $0,18 \times 10^{-13}$ moles (5,3 pg) d'hormone sont fixées par hypophyse, soit 0,002 % de la quantité injectée. Trois heures après l'injection initiale, $0,04 \times 10^{-13}$ moles (1,4 pg) sont encore détectables par organe.

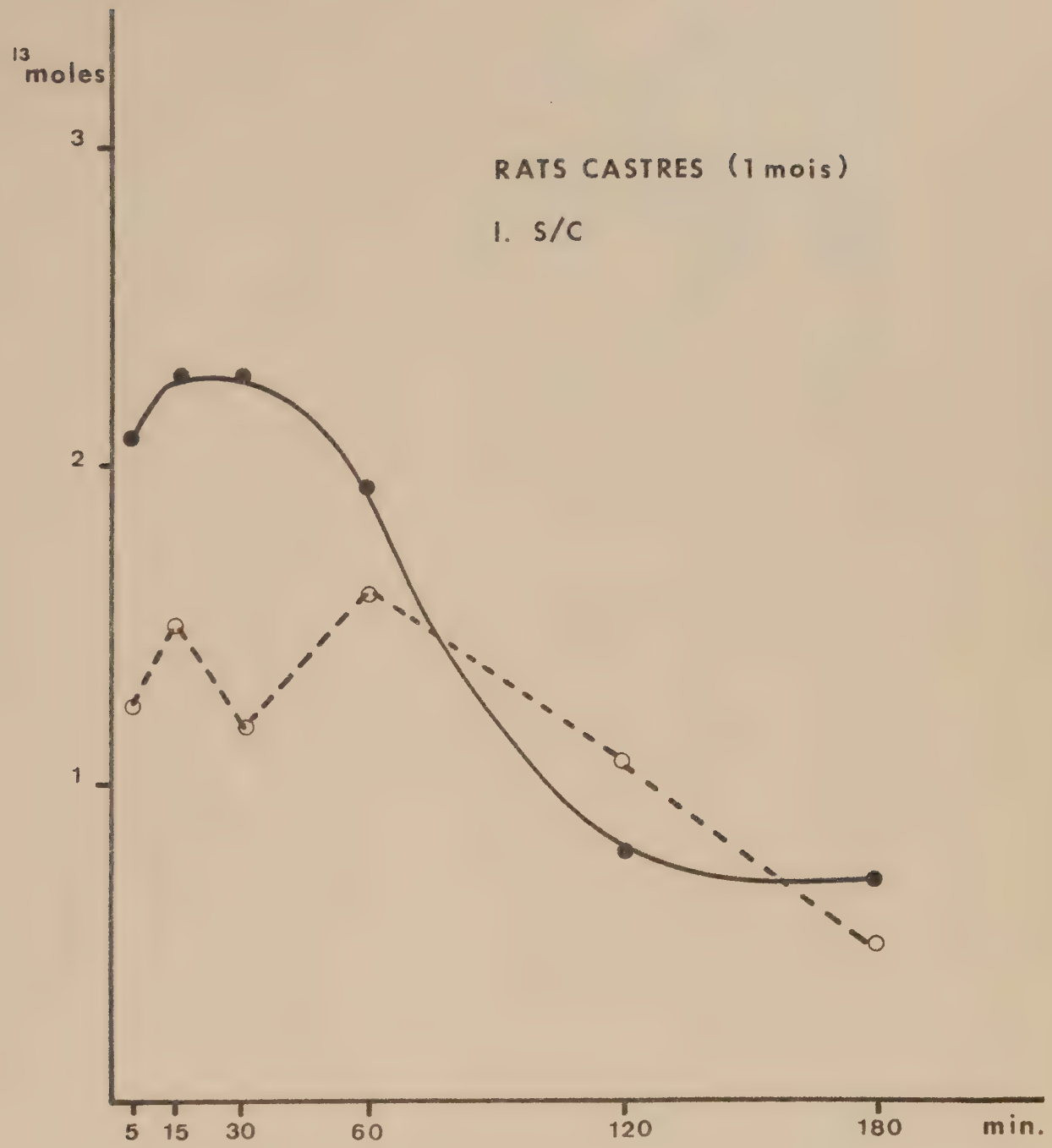


Fig. 4 - Incorporation, en fonction du temps, de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure (—●—), et le sérum (--○--) de rats castrés, après injection sous-cutanée.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.
- En abscisses, temps en minutes après l'injection de l'hormone.

TABLEAU VII

Etude de la pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H dans l'hypophyse antérieure et le sérum de rats castrés depuis 1 mois, après son injection sous-cutanée.

Résultats exprimés en pg de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum

et en moles de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.

	5 minutes	15 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	60 pg $2,08.10^{-13}$ m	66 pg $2,29.10^{-13}$ moles	66 pg $2,29.10^{-13}$ moles	56 pg $1,94.10^{-13}$ moles	22 pg $0,76.10^{-13}$ moles	20 pg $0,68.10^{-13}$ moles
Sérum	36 pg $1,25.10^{-13}$ m	44 pg $1,52 \pm 0,33.10^{-13}$ m	34 pg $1,18 \pm 0,24.10^{-13}$ m	47 pg $1,63 \pm 0,06.10^{-13}$ m	31 pg $1,07 \pm 0,33.10^{-13}$ m	14 pg $0,48 \pm 0,003.10^{-13}$ m

c) Rats adultes castrés depuis 2 mois

La testostérone-1,2-^{3}H a été administrée à des rats castrés depuis 2 mois, par voie sous-cutanée. Tous les organes présentent un maximum de pénétration de l'hormone 5 minutes après l'injection du stéroïde (Fig. 5) (Tableau VIII). La décroissance de la radioactivité est ensuite très rapide. Les courbes établies pour les différents organes, hypophyse antérieure, hypothalamus et cerveau, sont parallèles entre 30 et 180 minutes après l'injection (Figure 5) (Tableau VIII) ; la captation étant cependant plus importante pour l'hypophyse que pour l'hypothalamus et le cerveau qui présentent peu de différences.

Cinq minutes après l'administration du stéroïde, 0,13 x 10^{-13} moles (4 pg) de testostérone sont fixées par glande hypophysaire ; 0,29 x 10^{-13} moles (8,6 pg) par hypothalamus. Trois heures après l'injection de l'androgène, une hypophyse contient encore 0,05 x 10^{-13} moles (1,5 pg) de stéroïde.

L'étude du rapport H.A./C montre que la décroissance de la radioactivité dans l'hypophyse est parallèle à celle du cortex cérébral (Tableau IX). Ce rapport reste supérieur à 2 entre 15 et 180 minutes après l'injection de testostérone. La rétention de l'androgène dans l'hypophyse est assez faible. Le rapport H/C varie peu et reste très proche de l'unité pendant toute l'expérience.

Le rapport H.A./S, supérieur à l'unité aux temps initiaux,

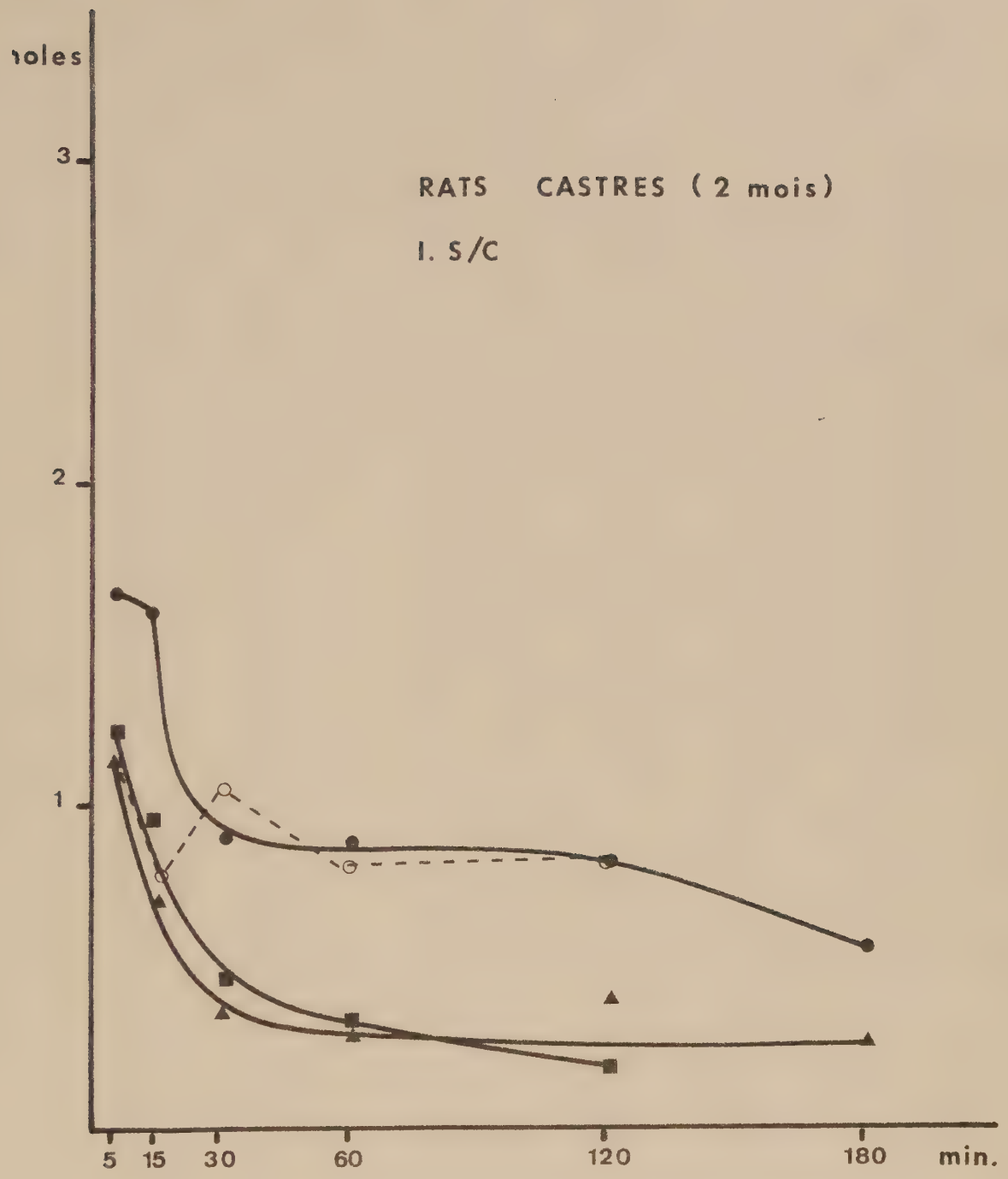


Fig. 5 - Incorporation, en fonction du temps, de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure (—●—), l'hypothalamus (—■—), le cortex cérébral (—▲—) et le sérum (- -○- -) de rats castrés, après injection sous-cutanée.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.
- En abscisses, temps en minutes après l'injection de l'hormone.

TABLEAU VIII

Etude de la pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cortex cérébral et le sérum de rats castrés depuis 2 mois, après son injection sous-cutanée.

Résultats exprimés en pg de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum.

et en moles de testostérone pour 100 mg de tissu ou 100 µl de sérum

	5 minutes	15 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	48 pg $1,66.10^{-13}$ moles	47 pg $1,63.10^{-13}$ moles	26 pg $0,90.10^{-13}$ moles	26 pg $0,90.10^{-13}$ moles	24 pg $0,83.10^{-13}$ moles	17 pg $0,59.10^{-13}$ moles
Hypothalamus	36 pg $1,25.10^{-13}$ moles	28 pg $0,97.10^{-13}$ moles	13 pg $0,45.10^{-13}$ moles	10 pg $0,34.10^{-13}$ moles	6 pg $0,20.10^{-13}$ moles	
Cerveau	33 pg $1,14.10^{-13}$ moles	21 pg $0,72.10^{-13}$ moles	10 pg $0,34.10^{-13}$ moles	9 pg $0,31.10^{-13}$ moles	12 pg $0,41.10^{-13}$ moles	8 pg $0,27.10^{-13}$ moles
Sérum	31 pg $1,07.10^{-13}$ moles	23 pg $0,79.10^{-13}$ moles	31 pg $1,07.10^{-13}$ moles	23 pg $0,79.10^{-13}$ moles	25 pg $0,86.10^{-13}$ moles	

décroît ensuite. Des résultats identiques sont obtenus pour le rapport H/S. (Tableau IX).

TABLEAU IX

Concentration de la radioactivité dans l'hypophyse antérieure (H.A.) et l'hypothalamus (H) de rats castrés depuis 2 mois, après injection sous-cutanée de testostérone-^{3}H par rapport au cortex cérébral (C) et au sérum (S). (C = 1, S = 1).

	$\frac{H.A}{C}$	$\frac{H}{C}$	$\frac{H.A}{S}$	$\frac{H}{S}$
5 minutes	1,45	1,09	1,5	1,16
15 minutes	2,2	1,33	2	1,2
30 minutes	2,6	1,3	0,83	0,42
60 minutes	2,8	1,1	0,78	0,43
120 minutes	2	0,5	0,96	0,24
180 minutes	2,1			

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

La testostérone-1,2-^{3}H a été administrée à des rats normaux ou castrés selon 2 voies différentes : intra-péritonéale ou sous-cutanée. Il est difficile d'établir des différences dans les modalités de la pénétration de l'hormone selon la voie d'injection. Dans les deux cas, voie sous-cutanée ou intra-péritonéale, la pénétration de la testostérone est rapide dans tous les organes étudiés : hypophyse antérieure, hypothalamus et cerveau. La décroissance est progressive pour la glande hypophysaire, rapide pour les organes nerveux.

On constate des différences dans le taux d'hormone fixé par 100 mg de tissu selon la voie d'administration utilisée. Quinze minutes après une injection intra-péritonéale de testostérone-^{3}H, l'hypophyse antérieure a un taux de radioactivité supérieur de 36 % à celui obtenu après injection sous-cutanée de la même quantité d'hormone. Trente minutes après l'injection intra-péritonéale, ce pourcentage d'augmentation est encore de 26 %. Par contre, 180 minutes après l'administration de l'hormone, la fixation hypophysaire est un peu plus forte par voie sous-cutanée qu'intra-péritonéale. Des résultats similaires sont obtenus pour l'hypothalamus et le cerveau.

La fixation des androgènes par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau est donc plus importante lorsque l'hormone a été administrée par voie intra-péritonéale. La pénétration de l'hormone dans ces

organes est plus lente lorsqu'elle a été injectée par voie sous-cutanée, ce qui se traduit par une rétention un peu plus importante. Les rapports H.A./C obtenus 180 minutes après l'injection intra-péritonéale sont plus faibles que ceux obtenus après administration sous-cutanée. Des résultats semblables sont obtenus pour l'hypothalamus.

D'une manière générale, la testostérone-^{3}H pénètre rapidement dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cortex cérébral et le sérum du rat normal ou castré. De ces trois organes, c'est l'hypophyse antérieure qui capte le plus intensément la radioactivité, suivie de l'hypothalamus. La partie frontale du cerveau et le cervelet ne présentent pas de différences et captent très faiblement la testostérone-^{3}H.

Les modalités de la pénétration de l'hormone mâle dans ces tissus sont assez voisines. Dans tous les cas, la pénétration de l'androgène est rapide et est suivie d'une diminution progressive de la radioactivité.

Des études autoradiographiques, effectuées par STUMPF, montrent également une concentration de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse et l'hypothalamus (122). Une heure après l'injection sous-cutanée de 0,5 à 1 µg de testostérone-^{3}H à des rats immatures ou adultes castrés, la radioactivité est concentrée dans le lobe antérieur de l'hypophyse mais pas dans les lobes intermédiaire et postérieur. Dans ce lobe antérieur, seules certaines cellules, de type basophile, retiennent sélectivement la radioactivité. STUMPF observe également une concentration de la radioactivité dans certains neurones de l'hypothalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale (122).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par WHALEN et LUTTGE (123). Ces auteurs étudient la pénétration et la rétention de la

testostérone-1,2-^{3}H dans différents organes, 5 et 60 minutes après son injection à des rats mâles castrés, adultes. Ils obtiennent la fixation d'androgène la plus élevée 5 minutes après l'injection dans le cas de l'hypophyse, de l'hypothalamus et du cortex cérébral (123). Quant aux tissus cibles, notamment les vésicules séminales, c'est 60 minutes après l'injection de l'hormone que la radioactivité présente un maximum (123).

De nombreux auteurs ont étudié la pénétration et la captation de la testostérone-1,2-^{3}H dans les organes cibles. FANG et LIAO constatent un maximum de radioactivité dans la prostate et les vésicules séminales quelques minutes après l'injection intra-péritonéale de ce stéroïde à des rats castrés (64). Ces auteurs observent ensuite une baisse progressive de la radioactivité captée par les organes cibles et une chute brusque dans les tissus musculaires tels que le diaphragme. Des résultats semblables sont obtenus par TVETER (63). Après injection intra-musculaire de testostérone-1,2-^{3}H à des rats orchidectomisés, le maximum de radioactivité est atteint, dans la prostate, 60 à 120 minutes après cette injection. Le taux de radioactivité décroît ensuite très progressivement puisque, 16 heures plus tard, un taux non négligeable d'androgène est encore mesurable (63). Par contre, la radioactivité musculaire et plasmatique décroît très rapidement après un maximum en 5 minutes.

Des études de captation de l'oestradiol par l'hypophyse et l'hypothalamus ont été effectuées *in vivo* et peuvent être comparées à la pénétration des androgènes dans ces organes. Après injection intra-péritonéale d'oestradiol-6,7-^{3}H à des rates adultes ovariectomisées, KATO montre que la fixation de l'hormone par l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus est

lente et n'atteint son maximum que 60 ou 120 minutes après l'injection initiale (107). Un tel processus avait été observé par JENSEN et JACOBSON dans leurs premiers travaux concernant la captation de l'oestradiol par l'utérus et le vagin (4). Après administration intra-veineuse d'oestradiol-^{3}H, EISENFELD compare la pénétration dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau et les organes cibles (108). La captation de l'oestradiol est rapide dans l'hypophyse et les tissus nerveux ; par contre, elle est retardée dans le vagin et l'utérus des mêmes animaux. La rétention de l'oestradiol-^{3}H par ces organes est très longue puisque la radioactivité de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus est encore mesurable 6 heures après l'injection de l'hormone (110).

La rétention de la testostérone-^{3}H par les organes de régulation et les tissus nerveux semble moins longue que celle observée dans les tissus cibles. En étudiant la quantité d'hormone fixée par l'ante-hypophyse et l'hypothalamus par rapport au cortex cérébral, on constate une rétention particulièrement élevée dans la glande pituitaire de rats gonadectomisés. Les valeurs obtenues après administration de testostérone-^{3}H à des rats castrés sont cependant inférieures à celles observées après injection d'oestradiol-^{3}H à des rates ovariectomisées (107). Deux heures après l'injection intra-péritonéale d'oestradiol-^{3}H, la radioactivité dans l'hypophyse antérieure est de 76 fois celle du cortex. Elle n'est que 5 fois supérieure à celle du cortex 120 minutes après l'injection intra-péritonéale de testostérone -^{3}H.

La rétention de la radioactivité dans l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus par rapport au sérum est peu élevée. L'accumulation spécifique est reflétée par un rapport tissu/plasma supérieur à l'unité (124). Nous avons obtenu de tels résultats pour les hypophyses antérieures d'animaux castrés depuis quinze jours et ayant reçu une injection intra-péritonéale

d'androgène. Dans ces expériences, la radioactivité hypophysaire est de deux fois supérieure à celle du sérum, 30 minutes après l'administration de l'hormone. Mc EWEN observe des résultats similaires après injection intrapéritonéale de testostérone-^{3}H à des rats castrés (125). Pour l'hypothalamus le rapport H/S est généralement égal ou inférieur à 0,5. D'après BARNEA qui décrit des résultats identiques après injection sous-cutanée de testostérone-^{3}H, ceci suggère un échange libre et rapide de stéroïde entre le tissu et le sang (124).

La castration ne semble pas avoir beaucoup d'influence sur les modalités de la pénétration de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure et les centres nerveux. Le maximum de pénétration est obtenu 5 minutes après l'injection pour tous les organes de rats normaux ou castrés. La décroissance de la radioactivité est rapide dans l'hypophyse des rats normaux alors qu'elle est beaucoup plus progressive dans l'hypophysede rats castrés depuis 15 jours ou 1 mois. On ne constate pas de différences significatives dans l'allure des courbes de pénétration de la testostérone-^{3}H dans l'hypothalamus et le cerveau de rats normaux ou castrés.

Nous avons constaté une augmentation très importante de la quantité d'androgène fixée par les organes de rats castrés. Cette augmentation est particulièrement significative pour l'hypophyse antérieure mais elle est également notable pour l'hypothalamus et le cerveau. L'étude des rapports H.A/C et H/C indique également une rétention hypophysaire et hypothalamique accrue lorsque les rats ont été orchidectomisés, l'accroissement le plus important étant celui de l'hypophyse antérieure.

Il n'y a pas de différences significatives dans la pénétration de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau lorsque les rats ont été castrés 15 ou 30 jours avant l'injection. Quinze jours après l'orchidectomie, la pénétration dans l'hypophyse antérieure est maximale 5 minutes après l'injection d'androgène et décroît ensuite très lentement. Par contre, la pénétration est un peu plus lente lorsque les rats ont été castrés un mois avant l'injection d'androgène. Le maximum de radioactivité est obtenu entre 15 et 30 minutes après l'administration de testostérone-1,2-^{3}H. Après une orchidectomie de 2 mois, on constate, pour la glande pituitaire, une captation d'hormone rapide suivie d'une décroissance brusque. Ce type de pénétration est semblable à celui observé après injection de testostérone-^{3}H à des rats normaux. Il n'y a pas de différences semblables pour l'hypothalamus et le cortex cérébral. Quelque soit le délai de castration, la pénétration de l'hormone mâle est rapide et décroît assez rapidement.

Les taux d'hormone fixés par 100 mg de tissu hypophysaire varient peu lorsque les rats ont été castrés 15 ou 30 jours avant l'injection. Ils sont cependant plus faibles lorsque l'animal est castré depuis deux mois. Cinq minutes après l'injection, $2,2 \times 10^{-13}$ moles de testostérone ont été fixées par 100 mg de tissu hypophysaire de rats orchidectomisés depuis 15 jours. Lorsque la castration a été effectuée 2 mois avant l'injection, la fixation atteint seulement $1,6 \times 10^{-13}$ moles de testostérone pour 100 mg.

On constate également une diminution de la fixation de la testostérone-^{3}H dans l'hypothalamus et le cerveau après une castration de deux mois.

ROY et LAUMAS démontrent également une rétention plus élevée de la testostérone-^{3}H, après injection intra-veineuse, dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus antérieur et moyen lorsque les animaux ont été gonadectomisés 1 mois avant cette injection (126). La captation de l'androgène est particulièrementaccrue pour la glande pituitaire (126). Des résultats comparables ont été obtenus par RESKO, GOY et PHOENIX (127). Après injection sous-cutanée de testostérone-^{3}H à des cobayes mâles adultes, castrés depuis 5 semaines, ces auteurs observent une rétention importante des androgènes par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cervelet. Ils constatent également que la captation hypophysaire est très supérieure à celle des tissus nerveux étudiés, hypothalamus et cervelet. WHALEN et LUTTGE font des observations semblables après injection d'oestradiol-^{3}H à des rates ovariectomisées (128). En effet, l'hypophyse retient des taux de radioactivité supérieurs à ceux du cortex cérébral. Deux heures après l'injection d'oestrogène, le rapport hypophyse/ hypothalamus est de 30 (128).

Après injection intra-péritonéale ou sous-cutanée de doses physiologiques de testostérone-^{3}H, nous avons constaté une captation rapide de cette hormone par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cerveau du rat normal ou castré. La fixation des androgènes est plus élevée dans l'hypophyse antérieure que dans l'hypothalamus, le cortex cérébral et le cervelet. Elle est très nettement augmentée 15 ou 30 jours après l'orchidectomie des animaux. Ceci est dû probablement à la suppression de la principale source endogène de testostérone, ce qui libère un certain nombre de sites de fixation de l'hormone. La pénétration de la testostérone-^{3}H est moins importante dans le tissu hypothalamique mais reste, cependant, plus élevée que dans le cortex cérébral et le cervelet. Ces deux organes ne présentent pas de différences

de captation de la testostérone-^{3}H.

C'est aussi pour l'hypophyse antérieure que la rétention est la plus importante par rapport au cerveau et au sérum, particulièrement lorsque le rat a été gonadectomisé 15 ou 30 jours préalablement à l'injection de l'androgène.

CHAPITRE II

ETUDE DES MODALITES DE LA PENETRATION DE LA TESTOSTERONE-1,2-^{3}H DANS DES COUPES D'HYPOPHYSE ANTERIEURE, D'HYPOTHALAMUS ET DE CORTEX CEREBRAL DU RAT NORMAL ET CASTRE.

S O M M A I R E

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Animaux
2) Testostérone-1,2-^{3}H
3) Prélèvement des organes
4) Incubation des tissus
5) Extraction de la radioactivité
6) Expression des résultats.

II - RESULTATS

1) Etude de la captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'organes de rats castrés depuis 15 jours, incubées en présence d'une quantité constante d'hormone.
2) Etude de l'incorporation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats castrés ou normaux, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu :
   a) En fonction du temps d'incubation
      α) Rats normaux
      β) Rats castrés depuis 25 jours
      γ) Rats castrés depuis 60 jours.
   b) En fonction du délai de castration, après 60 minutes d'incubation.

3) Etude de la captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau, incubées en présence d'inhibiteurs ou d'activateurs de la pénétration :

a) température

b) 2,4-dinitrophénol

c) A.T.P.

d) A.M.P. cyclique

4) Etude de la captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats castrés ou normaux, incubées en présence de doses croissantes de cette hormone.

III - CONCLUSIONS ET DISCUSSION DES RESULTATS.

INTRODUCTION

Après injection de testostérone-^{3}H à des rats normaux ou castrés, nous avons constaté une captation rapide de cette hormone par l'hypophyse antérieure et les centres nerveux supérieurs. Cette captation décroît ensuite progressivement. L'hypophyse antérieure se différencie de l'hypothalamus et du cerveau. Elle fixe des taux d'androgène supérieurs à ceux des centres nerveux et elle possède un taux de rétention de l'hormone également plus important. Ces résultats sont particulièrement significatifs après orchidectomie de l'animal.

Il nous a paru nécessaire d'étudier les modalités de la pénétration de la testostérone-1,2-^{3}H, *in vitro*, dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cortex cérébral du rat normal ou castré. Des incubations de coupes de ces organes ont été effectuées en présence d'une quantité d'hormone mâle constante ou proportionnelle au poids de tissus. Nous avons également cherché à savoir si la captation de l'androgène et son accumulation sont liées à certaines conditions de la perméabilité membranaire : transport actif ou diffusion passive.

Des incubations de coupes de tissu ont donc été effectuées en présence de facteurs activant ou inhibant la respiration cellulaire et la perméabilité de la membrane. Des essais ont été également réalisés pour

déterminer la capacité de fixation de l'hypophyse, de l'hypothalamus et du cerveau pour la testostérone-^{3}H. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la prostate, organe cible de la testostérone.

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1 - Animaux

Des rats mâles, de souche Wistar, pesant 230-270 g (âgés d'environ 60 jours), élevés dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre précédent, ont été utilisés pour ces expériences. Ils ont été orchidectomisés par voie péritonéale, sous anesthésie à l'éther, 15 jours, 21 jours, 1 mois et 2 mois avant le sacrifice.

2 - Testostérone-1,2-^{3}H

La testostérone-1,2-^{3}H, fournie par le C.E.N., possède une activité spécifique de 5, 6 Ci/mM. La solution initiale benzénique est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans 5 ml d'alcool absolu. Cette solution est diluée au 1/10 dans du liquide de Krebs et ajoutée au milieu d'incubation.

3 - Prélèvement des organes

Après anesthésie au nembutal, en solution dans du sérum physiologique (12 mg/rat), les rats sont décapités. L'hypothalamus, un fragment de lobe antérieur cérébral et l'hypophyse antérieure sont prélevés

rapidement, pesés et maintenus à 0°C pendant toute la durée des opérations d'ablation. Chaque organe est ensuite découpé en quatre parties avant d'être mis à incuber à 37°C.

4 - Incubation des tissus

Les coupes d'hypophyse, d'hypothalamus et de cerveau sont mises à incuber dans des fioles cylindriques de 15 ml. Lors de l'incubation d'une seule hypophyse, la glande est introduite dans un tube à hémolyse. Les incubations sont faites dans un thermostat agitateur de type Buhler, à 37°C, en présence d'oxygène et sous agitation constante. Le milieu de survie est constitué de liquide de Krebs dont la composition est la suivante : NaCl, 119 mM ; KCl, 4,5 mM ; $CaCl_2$, 1,9 mM ; $MgCl_2$, 3,1 mM ; $NaHCO_3$, 25 mM ; Na_2HPO_4, 0,45 mM ; glucose, 11,1 mM (129). Le pH est ajusté à 7,5 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Dans tous les cas, les organes sont soumis à une préincubation de 30 minutes dans le milieu de Krebs . Celui-ci est ensuite siphonné et remplacé par un volume déterminé de solution de Krebs renfermant la testostérone-^3H. La durée des incubations varie alors de 5 à 180 minutes.

Trois types d'expériences ont été réalisés. Les premières ont été effectuées en présence d'un volume constant de liquide de Krebs et d'une quantité identique de testostérone-^3H pour tous les organes. A chaque essai, les coupes de 5 hypophyses ont été mises à incuber dans 2 ml de solution de Krebs renfermant 0,2 µg d'hormone, soit une concentration tissulaire moyenne de 15 mg par ml de milieu d'incubation contenant 0,1 µg de testostérone-^3H ($0,3.10^{-9}$ moles de testostérone-^3H). Les coupes de 5 hypothalamus ou de 5

fragments de cortex ont été placées dans 4 ml de liquide de Krebs renfermant 0,2 µg d'hormone, ce qui représente une concentration de 0,05 µg de testostérone-^{3}H ($0,17.10^{-9}$ moles) par ml de liquide d'incubation contenant en moyenne 45 mg de tissu.

Les secondes ont été réalisées en présence d'une quantité de liquide de Krebs et d'hormone proportionnelle au poids de tissu, à savoir 25 mg de tissu pour 1 ml de solution d'incubation contenant 0,047 µg de testostérone-^{3}H ($0,16.10^{-9}$ moles). Dans certaines expériences, des facteurs influençant la pénétration intra-tissulaire de l'hormone sont ajoutés au liquide d'incubation.

Dans le troisième type d'expérience réalisé, chaque organe a été incubé dans un volume constant de liquide de Krebs, égal à 2 ml, contenant des doses croissantes de testostérone-^{3}H.

5 - Extraction de la radioactivité

A la fin de la période d'incubation, les fioles contenant les tissus sont placées à 0°C. La solution de Krebs est siphonnée et les coupes de tissu sont lavées 3 fois par 2 ml de liquide de Krebs contenant 2.10^{-3} g/l de testostérone non radioactive. La radioactivité des coupes est extraite par broyage au Potter, à 0°C, dans un mélange éthanol-éther éthylique à parties égales. Les fractions éthéro-alcooliques réunies sont évaporées à sec dans des fioles de comptage. Les résidus secs sont repris par 0,2 ml de NCS et additionnés de 10 ml de toluène scintillant. Le taux de radioactivité est mesuré par comptage en scintillation liquide.

6 - Expression des résultats

Les résultats obtenus représentant la moyenne de trois expériences sont exprimés en dpm et en moles pour 100 mg de tissu. Afin d'apprécier l'incorporation tissulaire de la radioactivité, nous avons effectué le rapport de la concentration de la radioactivité du tissu (en grammes) à celle du milieu d'incubation (en ml). Le pourcentage d'incorporation de la radioactivité par organe est également calculé.

II - RESULTATS

1 - Etude de la captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'organes de rats castrés depuis 15 jours, incubées en présence d'une quantité constante d'hormone

Cette étude effectuée *in vitro* montre une captation progressive de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cortex cérébral de rats castrés depuis 15 jours. Dans les conditions d'incubation utilisées (15 mg de tissu par ml de milieu d'incubation contenant 0,1 µg de testostérone-^{3}H), la pénétration de l'androgène est rapide dans l'hypophyse antérieure. Elle est déjà importante après 30 minutes d'incubation, mais n'est optimale qu'après 120 minutes. L'incorporation est alors de $1,59.10^{-10}$ moles pour 100 mg de tissu hypophysaire.(Figure 6, Tableau X).

L'incorporation de la testostérone-^{3}H par les tissus nerveux semble s'effectuer différemment (figure 6). Progressive pendant les 30 premières minutes de l'incubation, elle est ensuite constante. La fixation est de $0,52.10^{-10}$ moles de testostérone-^{3}H pour 100 mg de tissu hypothalamique après 60 minutes d'incubation et de $0,57.10^{-10}$ moles après 120 minutes (Tableau X). Des résultats comparables sont obtenus pour le cortex cérébral, le taux de fixation de l'hormone étant cependant inférieur à celui de l'hypothalamus (figure 6, Tableau X). On constate une diminution de la fixation de la testostérone-^{3}H pour tous les organes étudiés après 180 minutes d'incubation.

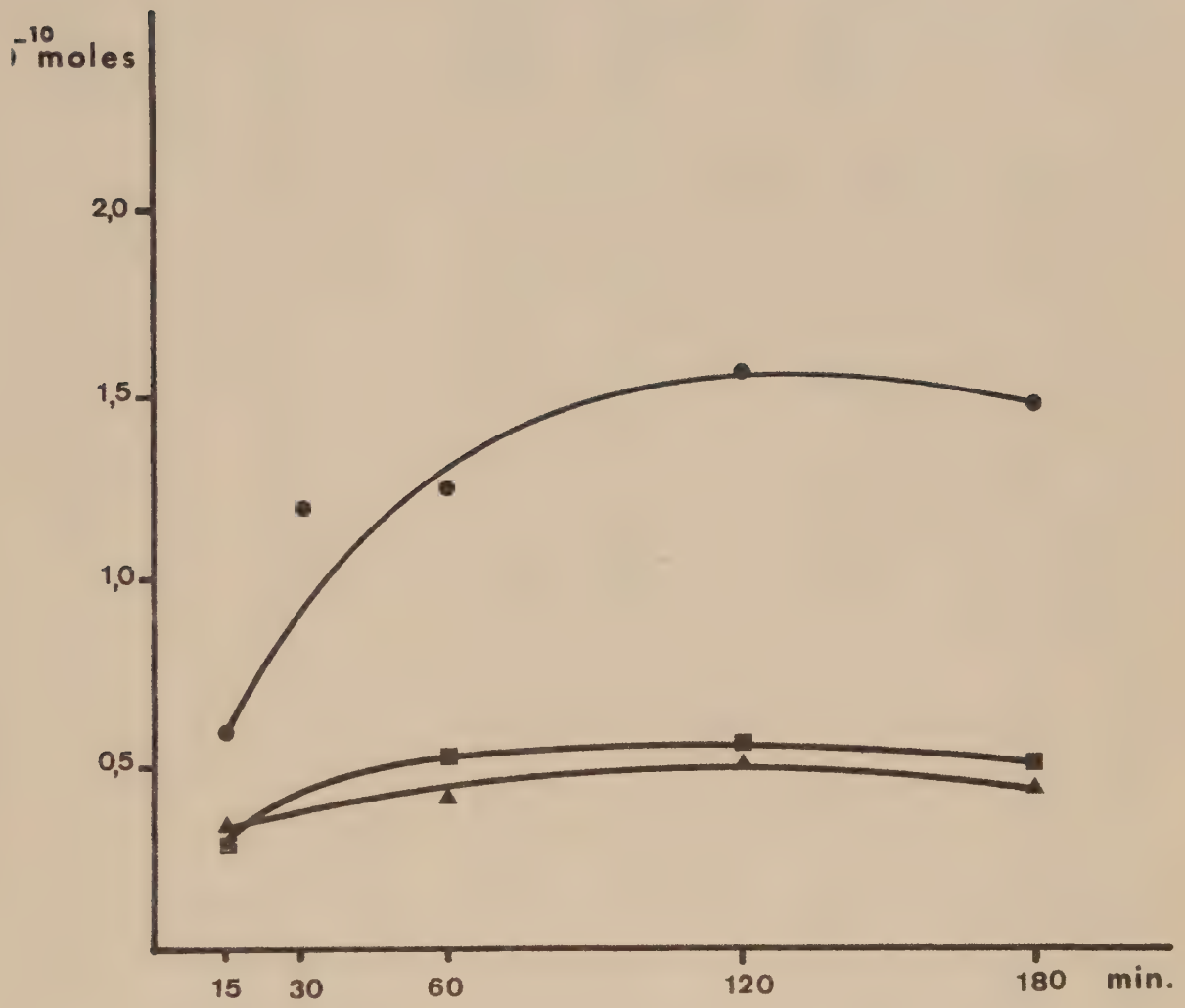


Fig. 6 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure (—●—), d'hypothalamus (—■—) et de cortex cérébral (—▲—) de rats castrés depuis 15 jours, incubées en présence d'une quantité constante d'hormone.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu.
- En abscisses, durée des incubations en minutes.

TABLEAU X

Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats castrés depuis 15 jours, incubées en présence d'une quantité constante d'hormone (0,2 µg)

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu, en moles pour 100 mg de tissu et en $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu d'incubation}}$

	15 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	760.000 dpm $0,59.10^{-10}$ moles 1,7	1.548.000 dpm $1,21.10^{-10}$ moles 3,5	1.610.000 dpm $1,25.10^{-10}$ moles 3,6	2.040.000 dpm $1,59.10^{-10}$ moles 4,6	1.020.000 dpm $1,49.10^{-10}$ moles 4,3
Hypothalamus	396.000 dpm $0,31.10^{-10}$ moles 18	588.000 dpm $0,45.10^{-10}$ moles 26,7	622.000 dpm $0,52.10^{-10}$ moles 30	727.000 dpm $0,57.10^{-10}$ moles 33	648.000 dpm $0,51.10^{-10}$ moles 29,4
Cerveau	435.000 dpm $0,34.10^{-10}$ moles 19,7	492.000 dpm $0,38.10^{-10}$ moles 22,3	545.000 dpm $0,41.10^{-10}$ moles 24,7	670.000 dpm $0,52.10^{-10}$ moles 30	570.000 dpm $0,45.10^{-10}$ moles 20

Il semble que la captation de l'androgène par les coupes d'hypophyse antérieure soit très supérieure à celle des organes nerveux. Ces résultats ne peuvent cependant pas être comparés en raison des différences de concentrations tissulaires et hormonales par ml de milieu d'incubation.

L'étude des rapports $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu d'incubation}}$ reflète ces différences. Ce rapport qui n'est pas supérieur à 4,6 pour l'hypophyse, a une valeur optimale de 33 pour les tissus nerveux.

2 - Etude de l'incorporation de la testostérone-1,2-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats normaux ou castrés, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids des tissus

a) en fonction du temps d'incubation

α) Rats normaux

L'incorporation de la radioactivité par les coupes d'hypophyse antérieure est très rapide (fig. 7). En effet, 5 minutes après le début de l'incubation, une glande hypophysaire a capté 8 % de la radioactivité du milieu d'incubation. Ceci représente une incorporation de $0,61.10^{-10}$ moles pour 100 mg de tissu hypophysaire (Tableau XI). Après 60 minutes d'incubation, la courbe présente un plateau. Le pourcentage de captation de l'hormone par hypophyse est de 17 % et reste constant jusqu'à la fin de l'incubation (fig. 7 Tableau XI).

Les courbes de pénétration de la testostérone-^{3}H dans les coupes d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux sont très voisines (fig. 7). L'incorporation de l'androgène par ces tissus est très rapide.

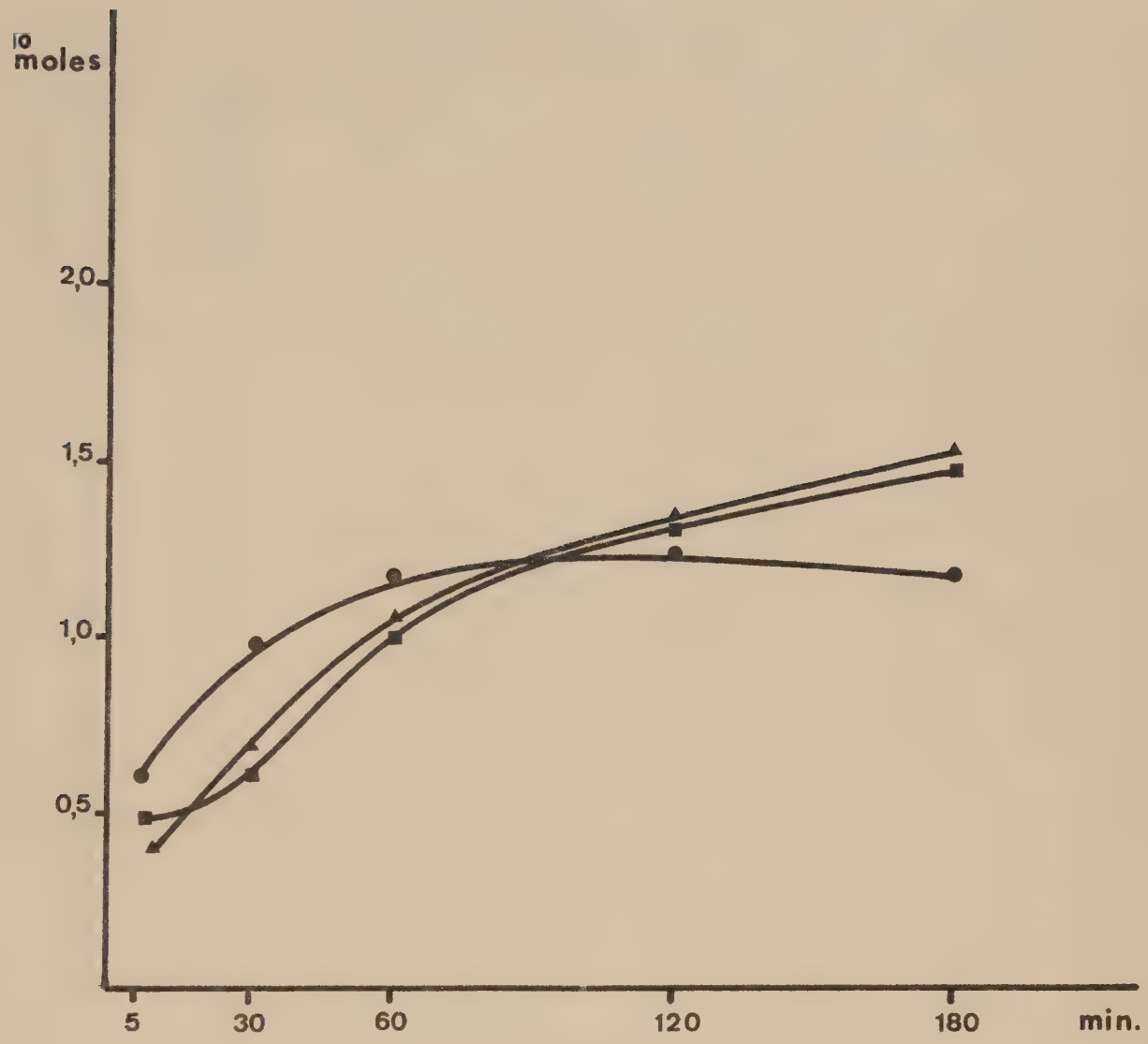


Fig. 7 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure (—●—), d'hypothalamus (—■—) et de cortex cérébral (—▲—) de rats normaux, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu.
- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu.
- En abscisses, durée des incubations en minutes.

TABLEAU XI

Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats normaux, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu.

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu, en moles pour 100 mg, en $\frac{\text{dpm/g tissu}}{\text{dpm/ml milieu}}$, et en % de radioactivité captée par organe.

	5 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	783.800 dpm $0,61.10^{-10}$ moles 3,9 8 %	1.259.000 dpm $0,99.10^{-10}$ moles 6,6 14,8 %	1.519.000 dpm $1,19 \pm 0,08.10^{-10}$ moles 7,5 17,6 %	1.592.000 dpm $1,25 \pm 0,02.10^{-10}$ moles 8,8 17,7 %	1.534.000 dpm $1,20.10^{-10}$ moles 8,2 17,1 %
Hypothalamus	619.700 dpm $0,48.10^{-10}$ moles 3,2 7,7 %	774.000 dpm $0,61.10^{-10}$ moles 4,1 9,5 %	1.354.000 dpm $1,06 \pm 0,06.10^{-10}$ moles 6,8 16,2 %	1.670.000 dpm $1,31 \pm 0,04.10^{-10}$ moles 9,8 20,6 %	1.923.000 dpm $1,51.10^{-10}$ moles 12 24 %
Cerveau	522.500 dpm $0,40.10^{-10}$ moles 2,6 6,1 %	886.500 dpm $0,69.10^{-10}$ moles 4,75 12,5 %	1.360.000 dpm $1,07 \pm 0,05.10^{-10}$ moles 7,2 15,8 %	1.706.500 dpm $1,34 \pm 0,03.10^{-10}$ moles 10 20,9 %	1.954.000 dpm $1,54.10^{-10}$ moles 12 23 %

Après 30 minutes d'incubation, l'hypothalamus a fixé 9,5 % de la radioactivité contenue dans le liquide de Krebs, le lobe antérieur cérébral 12,5 %. Ces deux tissus fixent une quantité croissante de radioactivité pendant les 180 minutes de l'incubation (tableau XI, fig. 7).

A la fin de la période d'incubation, 24 % de la testostérone-^{3}H présente initialement dans le milieu ont été captés par l'hypothalamus, 23 % par le cerveau. La fixation de la testostérone-^{3}H est alors de $1,51.10^{-10}$ moles pour 100 mg de tissu hypothalamique (Tableau XI).

Le rapport $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu}}$ qui exprime l'activité de la pénétration montre une concentration importante de la radioactivité dans les coupes des tissus incubés. Après 60 minutes d'incubation, ce rapport ne varie pas de manière significative pour la glande hypophysaire (Tableau XI) et sa valeur reste proche de 8. Des résultats différents sont observés pour l'hypothalamus et le cortex. Pour ces tissus, la valeur de ce rapport croît avec la durée de l'incubation et atteint une valeur de 12 après 180 minutes de maintien en survie (Tableau XI).

β) Rats castrés depuis 3 semaines

L'hypophyse antérieure de rats castrés depuis 3 semaines capte rapidement la testostérone-^{3}H. Après 30 minutes d'incubation, une glande hypophysaire a capté 17 % de la testostérone-^{3}H ajoutée au milieu de survie. Entre 30 et 60 minutes, la captation reste constante puis croît fortement pendant la deuxième heure de l'incubation (Tableau XII, fig. 8). Le pourcentage d'incorporation est alors de 26,4 %. Il n'est plus que de 20,4 % après 180 minutes d'incubation. Au temps de la pénétration optimale, la fixation est de $1,89.10^{-10}$ moles pour 100 mg de tissu.

Les coupes d'hypothalamus et de cortex cérébral captent la testostérone-^{3}H de manière progressive pendant les 180 minutes de l'incubation. Ces deux organes présentent peu de différences (figure 8). L'hypothalamus a cependant une capacité de fixation légèrement supérieure à celle du cortex cérébral. Pendant la première heure de l'incubation, ces deux tissus incorporent une quantité importante de radioactivité. L'hypothalamus capte 19,3 % de la testostérone-^{3}H présente dans le milieu, le cerveau 18,7 %. Entre 60 et 180 minutes, la courbe présente un plateau (figure 8). Après 120 minutes d'incubation, l'incorporation croît à nouveau (figure 8, Tableau XII). A la fin de la période d'incubation, 24 % de la radioactivité initiale ont été captés par l'hypothalamus, 23 % par le lobe cérébral antérieur. La fixation est alors de $1,56.10^{-10}$ moles pour 100 mg de tissu hypothalamique.

Le rapport $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu d'incubation}}$ montre une rétention élevée de la radioactivité par les coupes des organes incubés. La captation est particulièrement active par la glande pituitaire, après une durée d'incubation de 120 minutes. La valeur du rapport est alors de 12,5. Elle n'est que de 9,5 pour l'hypothalamus et de 8,25 pour le cerveau pour la même durée d'incubation. Pour ces deux organes, la valeur optimale de ce rapport n'est obtenue qu'après 180 minutes d'incubation (Tableau XII).

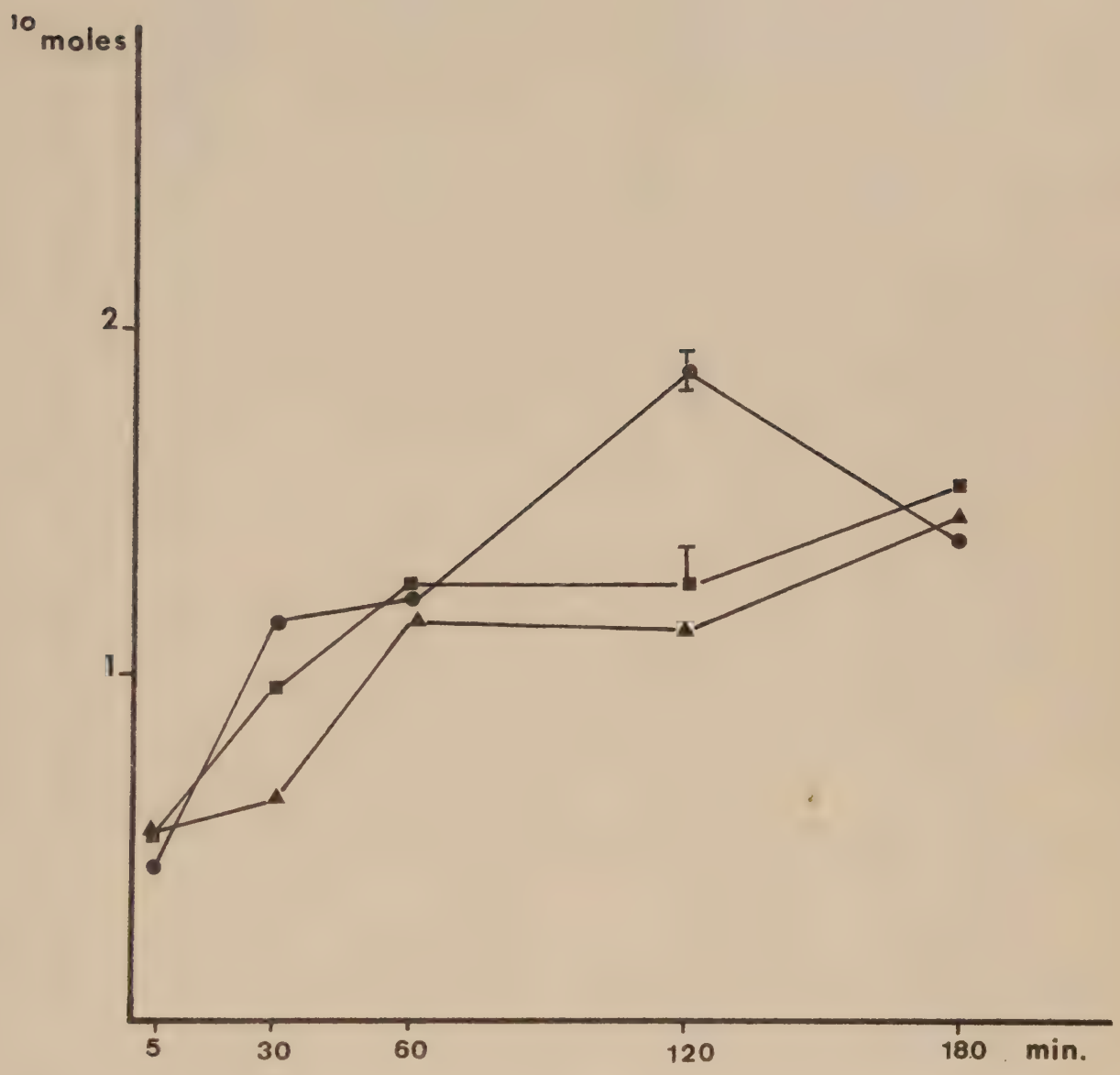


Fig. 8 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure (—●—), d'hypothalamus (—■—) et de cortex cérébral (—▲—) de rats castrés depuis 3 semaines, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu.
- En abscisses, durée des incubations en minutes.

TABLEAU XII

Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats castrés depuis 3 semaines, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu.

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu, en moles pour 100 mg de tissu, en $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu d'incubation}}$ et en % de radioactivité captée par organe.

	5 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Hypophyse antérieure	556.000 dpm $0,43.10^{-10}$ moles 2,8 5,1 %	1.470.000 dpm $1,16.10^{-10}$ moles 7,9 17 %	1.542.000 dpm $1,21.10^{-10}$ moles 8,3 17,6 %	2.403.000 dpm $1,89 \pm 0,05.10^{-10}$ moles 12,5 26,4 %	1.785.000 dpm $1,40.10^{-10}$ moles 9 20,4 %
Hypothalamus	660.000 dpm $0,52.10^{-10}$ moles 3,7 7,75 %	1.220.000 dpm $0,96.10^{-10}$ moles 7 14,5 %	1.586.000 dpm $1,25.10^{-10}$ moles 9,5 19,5 %	1.586.000 dpm $1,25 \pm 0,13.10^{-10}$ moles 9,5 19,5 %	1.984.000 dpm $1,56.10^{-10}$ moles 11 24 %
Cerveau	682.700 dpm $0,53.10^{-10}$ moles 3,6 7,9 %	800.000 dpm $0,63.10^{-10}$ moles 4,25 9,5 %	1.490.000 dpm $1,17.10^{-10}$ moles 8,8 18,7 %	1.422.500 dpm $1,12 \pm 0,05.10^{-10}$ moles 8,25 17 %	1.872.000 dpm $1,47.10^{-10}$ moles 11 23 %

γ) Rats castrés depuis 2 mois

L'incorporation de la testostérone-^{3}H par les coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats castrés depuis 2 mois a été étudiée pendant un temps variant entre 30 et 120 minutes (figure 9, Tableau XIII). La captation croît régulièrement en fonction de la durée des incubations pour les trois organes. Il n'y a pas de différences significatives dans la pénétration de l'hormone dans l'hypophyse et les organes nerveux. Après 120 minutes d'incubation, le pourcentage de pénétration est de 27,6 % pour la glande pituitaire, de 22 % pour l'hypothalamus et de 20,5 % pour le lobe cérébral antérieur (Tableau XIII).

TABLEAU XIII

Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse, d'hypothalamus et de cerveau de rats castrés depuis 2 mois, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu.

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu, en moles pour 100 mg de tissu, en $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu d'incubation}}$ et en % de radioactivité captée par organe.

	30 minutes	60 minutes	120 minutes
Hypophyse antérieure	1.347.000 dpm $1,06.10^{-10}$ moles 7 14,4 %	1.703.500 dpm $1,34.10^{-10}$ moles 9,8 18,6 %	2.136.000 dpm $1,68.10^{-10}$ moles 12,6 27,6 %
Hypothalamus	1.091.600 dpm $0,86.10^{-10}$ moles 6 13 %	1.607.000 dpm $1,26.10^{-10}$ moles 9,3 20 %	1.852.000 dpm $1,46.10^{-10}$ moles 11,7 22 %
Cerveau	1.184.000 dpm $0,93.10^{-10}$ moles 6,6 14 %	1.631.000 dpm $1,28.10^{-10}$ moles 9,7 20 %	1.757.000 dpm $1,38.10^{-10}$ moles 10,5 20,5 %

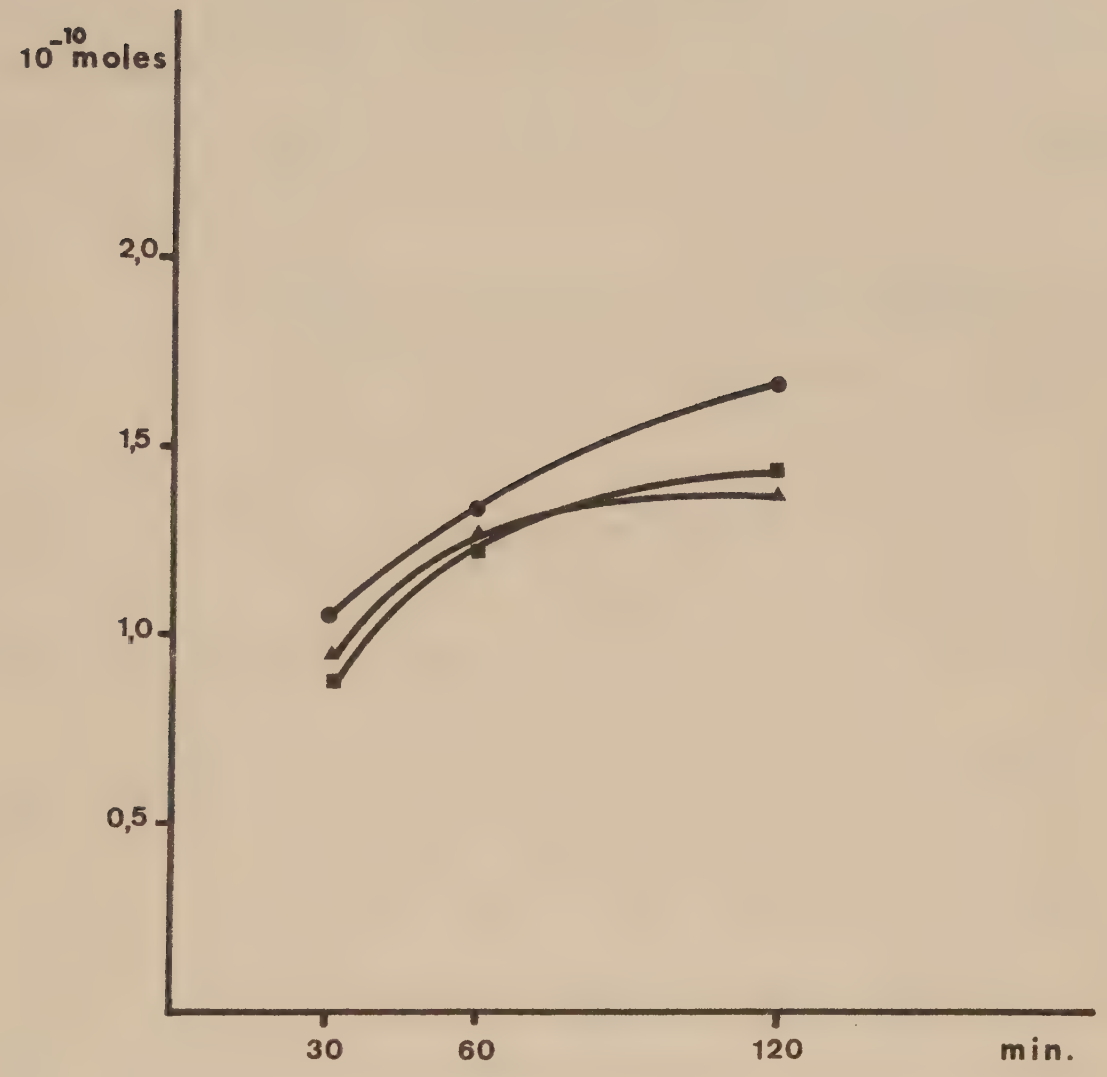


Fig. 9 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure (—●—), d'hypothalamus (—■—) et de cortex cérébral (—▲—) de rats castrés depuis 2 mois, incubées en présence d'une quantité d'hormone proportionnelle au poids de tissu.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu.
- En abscisses, durée des incubations en minutes.

Les valeurs obtenues pour le rapport $\frac{\text{dpm/g de tissu}}{\text{dpm/ml de milieu}}$ montrent une concentration importante de la radioactivité dans ces tissus. Ce rapport a une valeur de 12,6 pour les coupes d'hypophyse antérieure incubées pendant 120 minutes. Pour le même temps d'incubation, il est de 11,7 pour l'hypothalamus et de 10,5 pour le cerveau.

b) Etude de l'incorporation de la testostérone-^{3}H en fonction du délai de castration après 60 minutes d'incubation

La captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau,incubées pendant 60 minutes en présence de cette hormone, a été étudiée en fonction du délai de castration des animaux. Les rats ont été orchidectomisés 16, 21, 30, 60 jours avant cette étude.

Après 60 minutes d'incubation, la captation de l'androgène s'effectue d'une manière similaire quelque soit l'organe considéré (figure 10). Les taux de radioactivité fixés par 100 mg de tissu hypophysaire ou nerveux sont identiques pour chaque temps de castration (Tableau XIV). On ne constate pas de différences significatives dans l'incorporation de la radioactivité par les organes de rats normaux ou orchidectomisés depuis 16, 21 ou 30 jours.(figure 10, Tableau XIV).

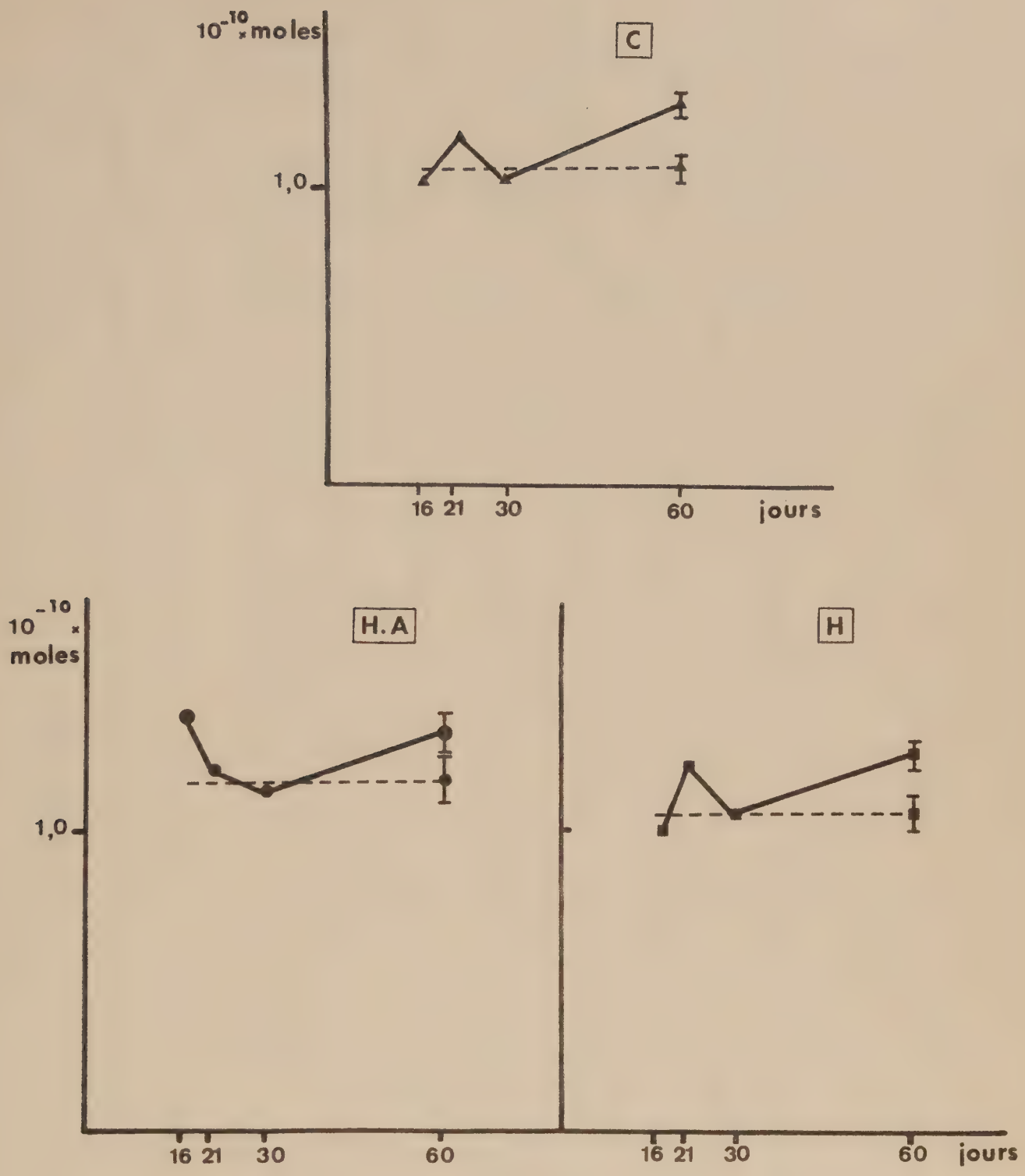


Fig. 10 - Captation de la testostérone-^{3}H en fonction du délai de castration après 60 minutes d'incubation de coupes d'hypophyse (H.A.), d'hypothalamus (H), de cortex cérébral (C).

- En abscisses, délai de castration en jours.
- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu.

TABLEAU XIV

Captation de la testostérone-^{3}H en fonction du délai de castration, après 60 minutes d'incubation.

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu et en moles de testostérone-^{3}H pour 100 mg de tissu.

	Rats normaux	Rats castrés : 16 jours	Rats castrés : 21 jours	Rats castrés : 30 jours	Rats castrés : 60 jours
Hypophyse antérieure	1.519.000 dpm $1,19 \pm 0,08.10^{-10}$ moles	1.790.000 dpm $1,4 \pm 0,1.10^{-10}$ moles	1.542.000 dpm $1,21.10^{-10}$ moles	1.454.000 dpm $1,14.10^{-10}$ moles	1.703.500 dpm $1,34 \pm 0,07.10^{-10}$ moles
Hypothalamus	1.354.000 dpm $1,06 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	1.305.000 dpm $1,02.10^{-10}$ moles	1.586.000 dpm $1,25.10^{-10}$ moles	1.378.000 dpm $1,08.10^{-10}$ moles	1.606.500 dpm $1,26 \pm 0,03.10^{-10}$ moles
Cerveau	1.360.000 dpm $1,07 \pm 0,05.10^{-10}$ moles	1.320.000 dpm $1,04.10^{-10}$ moles	1.490.000 dpm $1,17.10^{-10}$ moles	1.320.000 dpm $1,04.10^{-10}$ moles	1.627.000 dpm $1,28 \pm 0,02.10^{-10}$ moles

3 - Etude de l'incorporation de la testostérone-^{3}H en présence d'inhibiteurs ou d'activateurs de la pénétration intracellulaire.

a) Action de la température après 60 minutes d'incubation

Après 30 minutes de préincubation à 0°C, des incubations de coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats normaux ou castrés sont effectuées à 0°C pendant 60 minutes.

α) Rats normaux

Après 60 minutes d'incubation à 0°C, les coupes d'hypophyse antérieure fixent en moyenne $0,6.10^{-10}$ moles de testostérone-^{3}H pour 100 mg de tissu, ce qui représente une diminution de 16 % par rapport aux organes témoins incubés à 37°C. Cette diminution n'est cependant pas significative ($P > 0,05$). La baisse de captation de l'androgène est plus importante pour les tissus nerveux. La captation par 100 mg de tissu hypothalamique est de $0,34.10^{-10}$ moles de testostérone-^{3}H, soit une diminution de 54 % par rapport aux coupes incubées à 37°C. ($P < 0,01$). Des résultats semblables sont obtenus après incubation de coupes de cortex cérébral. La fixation par les coupes de cerveau incubées à 0°C est abaissée de 42 % ($P < 0,01$). (Figure 11, Tableau XV).

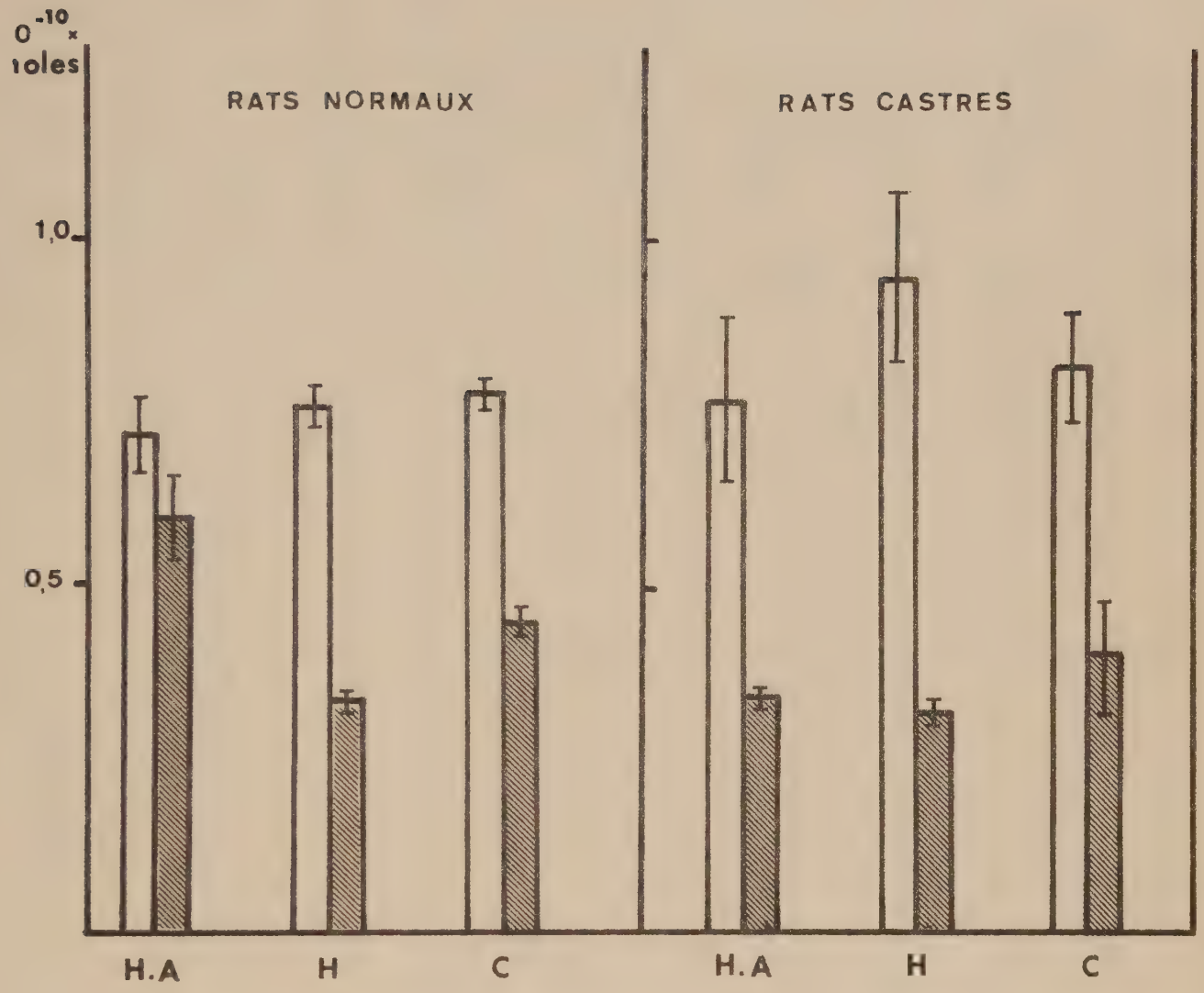


Fig. 11 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure (H.A.), d'hypothalamus (H) et de cortex (C) de rats castrés ou normaux incubées pendant 60 minutes à 37°C (barres blanches) ou à 0°C (barres hachurées).
- En ordonnées, moles de testostérone-^{3}H pour 100 mg de tissu.

TABLEAU XV

Influence de la température du milieu d'incubation sur la captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats normaux ou castrés, incubées 60 minutes.

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu et en moles de testostérone-^{3}H pour 100 mg de tissu.

	Rats normaux		Rats castrés (1 mois)	
	Témoin 37°C	Essai 0°C	Témoin 37°C	Essai 0°C
Hypophyse antérieure	922.200 dpm $0,72 \pm 0,05.10^{-10}$ moles	771.000 dpm $0,60 \pm 0,06.10^{-10}$ moles $P > 0,05$	986.900 dpm $0,77 \pm 0,12.10^{-10}$ moles	440.200 dpm $0,34 \pm 0,01.10^{-10}$ moles $0,05 > P > 0,01$
Hypothalamus	996.800 dpm $0,76 \pm 0,03.10^{-10}$ moles	440.000 dpm $0,34 \pm 0,001.10^{-10}$ moles $P < 0,01$	1.218.300 dpm $0,95 \pm 0,12.10^{-10}$ moles	415.200 dpm $0,32 \pm 0,01.10^{-10}$ moles $P < 0,01$
Cerveau	997.500 dpm $0,78 \pm 0,02.10^{-10}$ moles	572.100 dpm $0,45 \pm 0,02.10^{-10}$ moles $P < 0,01$	1.049.500 dpm $0,82 \pm 0,08.10^{-10}$ moles	513.800 dpm $0,40 \pm 0,08.10^{-10}$ moles $P < 0,01$

β) Rats castrés depuis 1 mois

Après incubation d'une heure à 0°C, les coupes d'hypophyse antérieure ont une captation diminuée de 55 % par rapport aux organes témoins. La probabilité est comprise entre 0,05 et 0,01. (Tableau XV, figure 11). La captation de la testostérone-^{3}H par les tissus nerveux de rats castrés, comparée à celle des coupes témoins incubées à 37°C, est abaissée de 51 % pour le cortex cérébral et de 66 % pour l'hypothalamus ($P < 0,01$), (Tableau XV, figure 11).

La captation de l'androgène à 0°C est donc inférieure à celle obtenue à 37°C. Elle est diminuée d'environ 50 %, quelque soit l'état de l'animal, pour les tissus des centres nerveux supérieurs. Par contre, la fixation de la testostérone-^{3}H par les coupes d'hypophyse antérieure incubées à 0°C n'est abaissée dans les mêmes proportions qu'après gonadectomie de l'animal (Tableau XV).

b) Action du 2,4-dinitrophénol après 120 minutes d'incubation

A la concentration de 5×10^{-7} moles par ml de liquide d'incubation, le 2,4-dinitrophénol ne produit pas de modifications dans la captation de la testostérone-^{3}H par les coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cerveau de rats normaux (Tableau XVI, Figure 12). Pour ces trois organes, la fixation de testostérone-^{3}H est identique dans l'essai incubé en présence de 2,4-dinitrophénol et dans l'essai témoin incubé en présence d'hormone seule (Tableau XVI). Les différences observées ne sont pas significatives. Ces résultats semblent doncindiquer que l'accumulation de l'androgène n'est pas liée aux phénomènes de la respiration cellulaire et de la phosphorilation oxydative.

TABLEAU XVI

Incorporation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux, incubées 120 minutes en présence de 2,4-dinitrophénol (5.10^{-7} moles/ml).

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu et en moles de testostérone pour 100 mg de tissu.

	Témoin	Essai
Hypophyse antérieure	1.705.800 dpm $1,34 \pm 0,09.10^{-10}$ moles	1.837.500 dpm $1,44 \pm 0,06.10^{-10}$ moles P > 0,05
Hypothalamus	1.922.100 dpm $1,51 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	2.085.000 dpm $1,64 \pm 0,02.10^{-10}$ moles P > 0,05
Cerveau	2.083.900 dpm $1,64 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	2.298.900 dpm $1,81 \pm 0,03.10^{-10}$ moles P > 0,05

c) Action de l'A.T.P. sur la captation de la testostérone-^{3}H après 120 minutes d'incubation

L'addition de 2×10^{-7} moles d'A.T.P. par ml de milieu d'incubation, contenant $1,3.10^{-10}$ moles de testostérone-^{3}H, provoque une

une augmentation de la captation de la testostérone-^{3}H par les coupes d'hypophyse antérieure de rats normaux incubées durant 120 minutes (Tableau XVII, figure 12). Cette captation est augmentée de 22 % par rapport aux organes témoins incubés dans les mêmes conditions, sans A.T.P. ($0,05 > P > 0,01$).

Par contre, dans les mêmes conditions d'incubation, l'A.T.P. n'a pas d'action sur l'incorporation de la testostérone-^{3}H par les coupes d'hypothalamus et de cerveau de rats normaux (figure 12). La fixation d'hormone par 100 mg de tissu est identique dans le témoin et dans l'essai contenant l'A.T.P. (Tableau XVII).

TABLEAU XVII

Incorporation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux, incubées 120 minutes en présence d'A.T.P. (2.10^{-7} moles/ml).
Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu et en Moles de testostérone pour 100 mg de tissu.

	Témoin	Essai
Hypophyse antérieure	2.067.600 dpm $1,62 \pm 0,09.10^{-10}$ moles	2.528.000 dpm $1,99 \pm 0,006.10^{-10}$ moles $0,05 > P > 0,01$
Hypothalamus	2.329.000 dpm $1,83 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	2.205.400 dpm $1,76 \pm 0,05.10^{-10}$ moles
Cerveau	2.525.900 dpm $1,99 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	2.434.000 dpm $1,92 \pm 0,03.10^{-10}$ moles

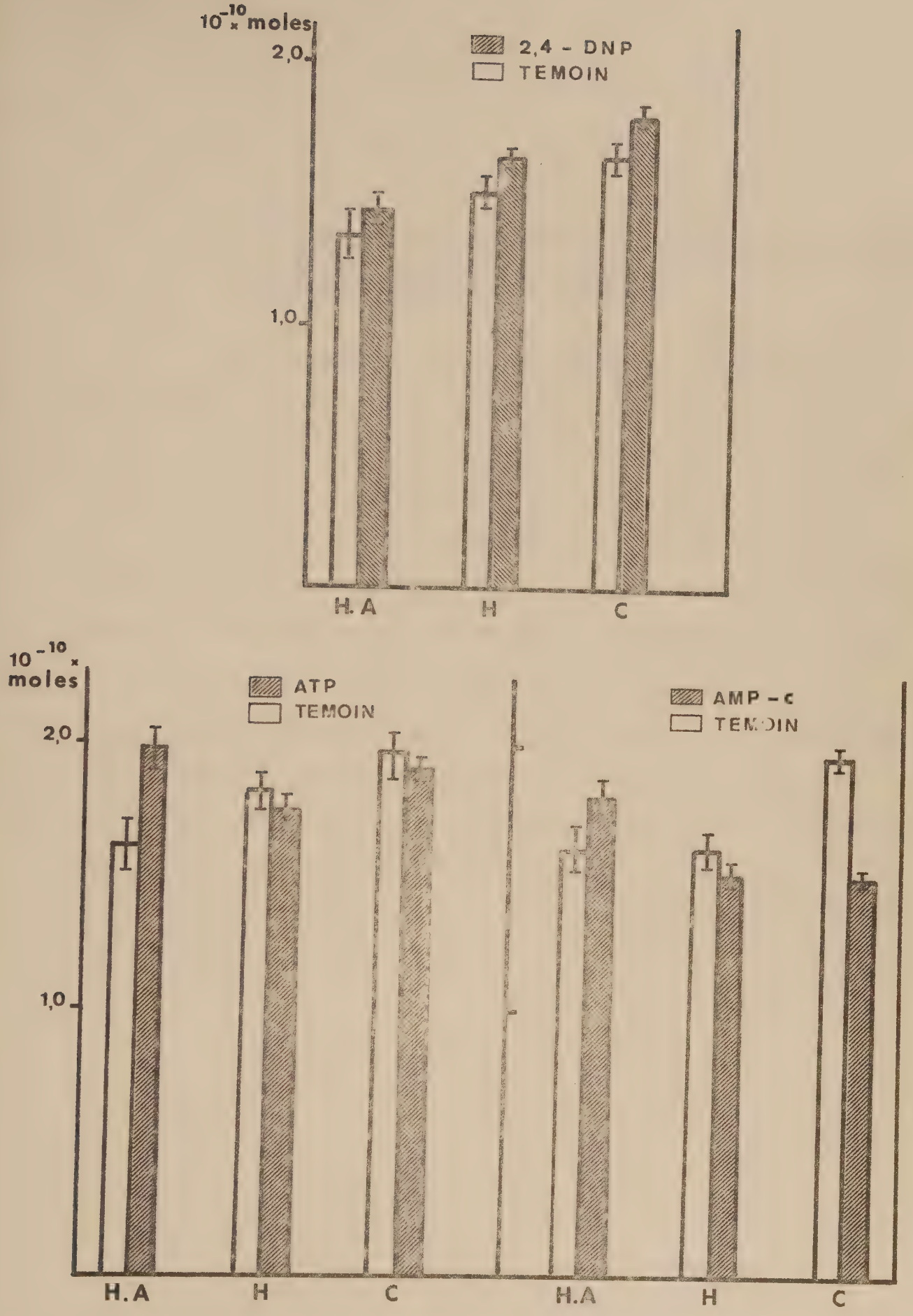


Fig. 12 - Incorporation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse (H.A.), d'hypothalamus (H), de cerveau (C), incubées en présence de 2,4-dinitrophénol, d'ATP ou d'AMP cyclique.

- En ordonnées, testostérone-^{3}H en moles pour 100 mg de tissu.

d) Action du 3',5'-A.M.P. cyclique sur la captation de la testostérone-^{3}H après 120 minutes d'incubation

Des incubations d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux ont été effectuées, pendant 120 minutes, en présence de $1,3.10^{-10}$ moles de testostérone-^{3}H et de 3.10^{-7} moles d'A.M.P. cyclique par ml de milieu d'incubation. On constate que la captation de l'hormone par l'hypophyse antérieure, incubée en présence de 3',5'-A.M.P. cyclique, est supérieure de 17 % à celle des organes témoins (Tableau XVIII, figure 12). Cette différence n'est cependant pas significative : $P > 0,05$.

Par contre, l'A.M.P. cyclique ne produit pas d'augmentation de la pénétration de l'androgène dans les tissus nerveux de rats normaux (Tableau XVIII, Figure 12). La fixation d'hormone par les coupes d'hypothalamus, incubées en présence d'A.M.P. cyclique est inférieure à celle des organes témoins ($0,05 > P > 0,01$). Des résultats similaires sont obtenus pour le cortex cérébral (Tableau XVIII). La différence n'est cependant pas significative pour cet organe ($P < 0,01$).

TABLEAU XVIII

Incorporation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux, incubées 120 minutes en présence de 3',5'-A.M.P. cyclique (3.10^{-7} moles/ml).

Résultats exprimés en dpm pour 100 mg de tissu et en moles de testostérone pour 100 mg de tissu.

	Témoin	Essai
Hypophyse antérieure	2.067.000 dpm $1,62 \pm 0,09.10^{-10}$ moles	2.434.000 dpm $1,92 \pm 0,06.10^{-10}$ moles $P > 0,05$
Hypothalamus	2.329.000 dpm $1,83 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	1.944.000 dpm $1,53 \pm 0,05.10^{-10}$ moles $0,05 >> P > 0,01$
Cerveau	2.525.900 dpm $1,99 \pm 0,06.10^{-10}$ moles	1.939.000 dpm $1,52 \pm 0,02.10^{-10}$ moles $P < 0,01$

4.- Etude de la pénétration de la testostérone-^{3}H par des coupes de tissu de rats normaux ou castrés en présence de doses croissantes de cette hormone

Pour déterminer la capacité de fixation pour la testostérone des tissus nerveux et de l'hypophyse, des incubations de coupes de ces tissus ont été effectuées en présence de doses croissantes de cette hormone. Pour cette étude réalisée à 37°C, tous les organes ont été préincubés et incubés dans 2 ml de liquide de Krebs, pendant 120 minutes, en présence de quantités de testostérone froide et tritiée comprises entre $0,04 \times 10^{-9}$ Moles et 35×10^{-9} moles.

Rats castrés depuis 40 jours

L'addition de doses croissantes de testostérone-^{3}H au milieu d'incubation de coupes d'hypophyses antérieures, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats castrés montre que la pénétration intratissulaire de l'hormone est proportionnelle à la concentration de la testostérone-^{3}H du milieu si celle-ci est inférieure à $6,56.10^{-9}$ moles/2 ml (1800 ng) (Tableau XIX). L'incorporation semble diminuér lorsque la concentration en testostérone-^{3}H est comprise entre $6,56.10^{-9}$ moles/2 ml et $19,68.10^{-9}$ moles (Figure 13, Tableau XIX). Pour des concentrations supérieures à 20.10^{-9} moles d'androgène par 2 ml de milieu d'incubation, la pénétration de l'hormone dans les tissus est à nouveau proportionnelle à la dose de testostérone-^{3}H du milieu d'incubation (Tableau XIX, figure 13).

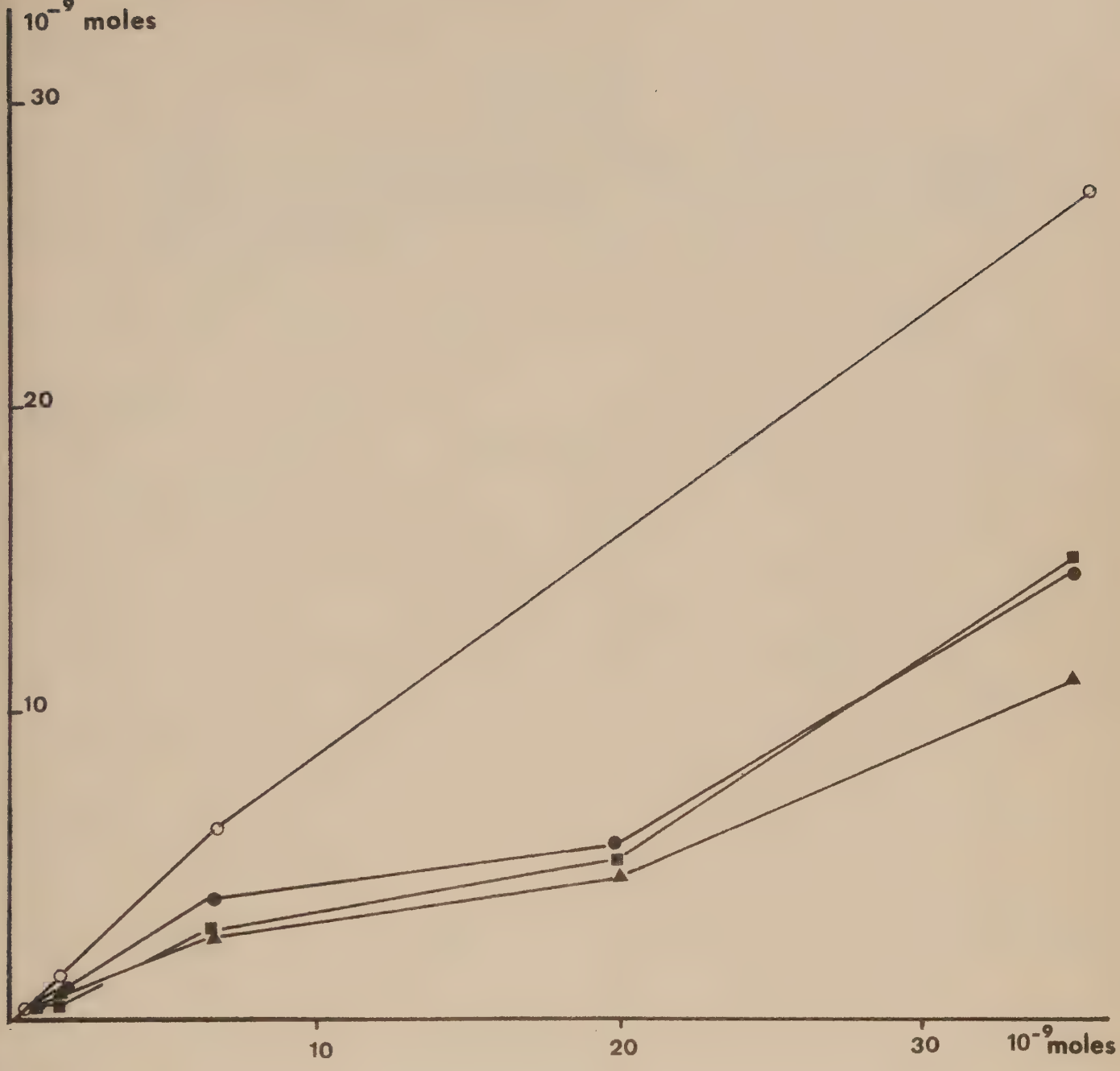


Fig. 13 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse (—●—), d'hypothalamus (—■—), de cerveau (—▲—) de prostate (—○—) de rats castrés, incubées 120 minutes en présence de doses croissantes de cette hormone.

- En abscisses, moles de testostérone-^{3}H ajoutées au milieu d'incubation.
- En ordonnées, moles de testostérone-^{3}H captées par 100 mg de tissu.

TABLEAU XIX

Pénétration de la testostérone-^{3}H dans les coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats castrés après 120 minutes d'incubation à 37°C dans 2 ml de liquide de Krebs en présence de doses croissantes d'hormone.

Résultats exprimés en moles de testostérone pour 100 mg de tissu.

Testostérone ajoutée	Hypophyse antérieure	Hypothalamus	Cerveau	Prostate
$0,04.10^{-9}$ moles	$0,02.10^{-9}$ moles	$0,01.10^{-9}$ moles	$0,01.10^{-9}$ moles	
$0,08.10^{-9}$ moles	$0,04.10^{-9}$ moles	$0,02.10^{-9}$ moles	$0,03.10^{-9}$ moles	
$0,12.10^{-9}$ moles	$0,05.10^{-9}$ moles	$0,04.10^{-9}$ moles	$0,04.10^{-9}$ moles	
$0,16.10^{-9}$ moles	$0,07.10^{-9}$ moles	$0,06.10^{-9}$ moles	$0,05.10^{-9}$ moles	
$0,23.10^{-9}$ moles	$0,11.10^{-9}$ moles	$0,08.10^{-9}$ moles	$0,07.10^{-9}$ moles	
$0,33.10^{-9}$ moles	$0,13.10^{-9}$ moles	$0,10.10^{-9}$ moles	$0,10.10^{-9}$ moles	
$0,44.10^{-9}$ moles	$0,23.10^{-9}$ moles	$0,16.10^{-9}$ moles	$0,14.10^{-9}$ moles	$0,22.10^{-9}$ moles
$0,60.10^{-9}$ moles	$0,3\ .10^{-9}$ moles	$0,23.10^{-9}$ moles	$0,19.10^{-9}$ moles	
$0,89.10^{-9}$ moles	$0,44.10^{-9}$ moles	$0,35.10^{-9}$ moles	$0,30.10^{-9}$ moles	$0,67.10^{-9}$ moles
$1,79.10^{-9}$ moles	$0,93.10^{-9}$ moles	$0,54.10^{-9}$ moles	$0,68.10^{-9}$ moles	$1,27.10^{-9}$ moles
$6,56.10^{-9}$ moles	$1,98.10^{-9}$ moles	$1,67.10^{-9}$ moles	$1,59.10^{-9}$ moles	$6,3\ .10^{-9}$ moles
$19,68.10^{-9}$ moles	$6,57.10^{-9}$ moles	$5,08.10^{-9}$ moles	$4,7\ .10^{-9}$ moles	
$35,17.10^{-9}$ moles	$14,44.10^{-9}$ moles	$15,02.10^{-9}$ moles	$11,06.10^{-9}$ moles	$27,08.10^{-9}$ moles

L'incorporation dans ces organes en présence de doses d'hormone croissante peut être comparée à celle de la prostate. Pour cet organe cible, la captation est proportionnelle à la concentration de testostérone-^{3}H présente dans le milieu. La concentration de l'androgène par la prostate du rat castré est supérieure à celle des centres nerveux supérieurs et de l'hypophyse antérieure.

Rats normaux

Des coupes de tissus de rats normaux ont été incubées dans les mêmes conditions en présence de doses de testostérone-^{3}H comprises entre $0,16 \times 10^{-9}$ moles et 6×10^{-9} moles (Tableau XX, figure 14). La capacité de fixation des organes est également proportionnelle à la concentration hormonale du milieu. Cependant les taux de radioactivité fixés par 100 mg de tissu hypophysaire et prostatique sont similaires et supérieurs à ceux de l'hypothalamus et du cerveau. D'une manière générale, ces résultats montrent que l'hypophyse du rat castré capte davantage d'hormone que l'hypothalamus et le cerveau.

Le rapport $\frac{\text{dpm/g tissu}}{\text{dpm/ml milieu}}$ est en moyenne de 10 pour l'hypophyse antérieure, 8,8 pour l'hypothalamus et 9 pour le cerveau.

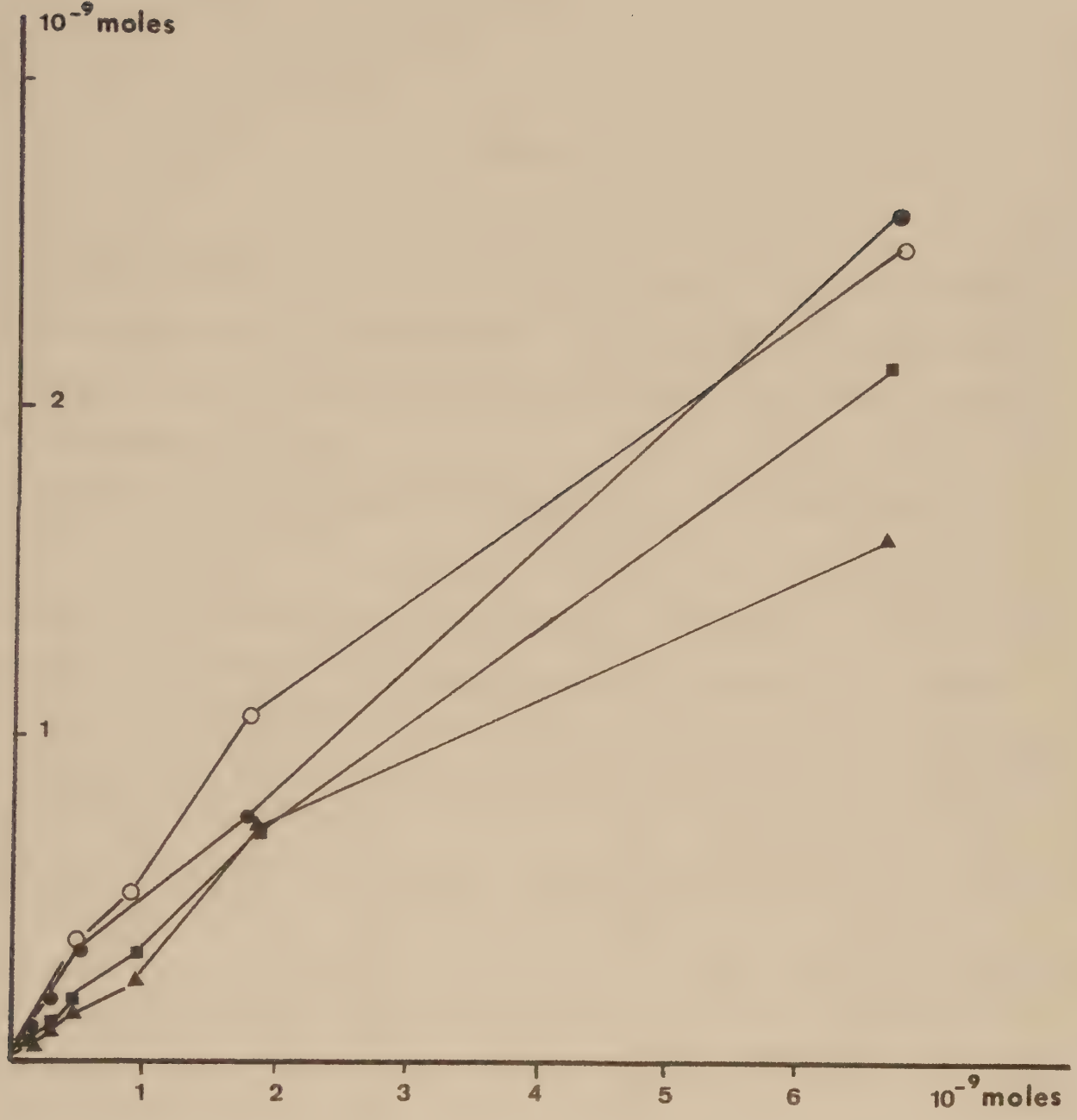


Fig. 14 - Captation de la testostérone-^{3}H par des coupes d'hypophyse (—●—), d'hypothalamus (—■—), de cerveau (—▲—) de prostate (—○—) de rats normaux, incubées 120 minutes en présence de doses croissantes de cette hormone.

- En abscisses, moles de testostérone-^{3}H ajoutées au milieu d'incubation.
- En ordonnées, moles de testostérone-^{3}H captées par 100 mg de tissu.

TABLEAU XX

Pénétration de la testostérone-^{3}H dans des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux après 120 minutes d'incubation à 37°C dans 2 ml de liquide de Krebs, en présence de doses croissantes d'hormone.

Résultats exprimés en moles de testostérone pour 100 mg de tissu.

Testostérone ajoutée	Hypophyse antérieure	Hypothalamus	Cerveau	Prostate
$0,16.10^{-9}$ moles	$0,09.10^{-9}$ moles	$0,08.10^{-9}$ moles	$0,06.10^{-9}$ moles	$0,12.10^{-9}$ moles
$0,33.10^{-9}$ moles	$0,16.10^{-9}$ moles	$0,11.10^{-9}$ moles	$0,09.10^{-9}$ moles	$0,18.10^{-9}$ moles
$0,44.10^{-9}$ moles	$0,36.10^{-9}$ moles	$0,19.10^{-9}$ moles	$0,15.10^{-9}$ moles	$0,38.10^{-9}$ moles
$0,89.10^{-9}$ moles	$0,49.10^{-9}$ moles	$0,33.10^{-9}$ moles	$0,24.10^{-9}$ moles	$0,52.10^{-9}$ moles
$1,79.10^{-9}$ moles	$0,74.10^{-9}$ moles	$0,69.10^{-9}$ moles	$0,69.10^{-9}$ moles	$1,08.10^{-9}$ moles
$6,56.10^{-9}$ moles	$2,67.10^{-9}$ moles	$2,16.10^{-9}$ moles	$1,64.10^{-9}$ moles	$2,5.\ 10^{-9}$ moles

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les résultats obtenus montrent une incorporation de l'hormone mâle dans les coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus, de cortex cérébral de rats normaux ou castrés, incubées à 37°C en présence de cette hormone. L'une des caractéristiques de la pénétration de la testostérone-^{3}H dans les coupes de ces tissus est sa rapidité puisque, 5 minutes après le début de l'incubation, une quantité de radioactivité non négligeable peut y être décelée. Lorsque les coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex sont incubées dans des conditions identiques, la captation de la testostérone-^{3}H par ces tissus est de 8 % pour l'hypophyse et de 6 à 7 % pour les tissus nerveux après 5 minutes d'incubation.

Une autre caractéristique de cette incorporation de l'hormone mâle est sa progressivité. La pénétration de la testostérone-^{3}H dans la glande pituitaire croît pendant les 60 ou 120 premières minutes de l'incubation. Par contre, l'incorporation de la testostérone-^{3}H par les organes nerveux diffère selon les conditions de l'incubation. Lorsque la concentration tissulaire par ml de milieu d'incubation, contenant 50 ng de testostérone-^{3}H, est supérieure ou égale à 45 mg de tissu, la pénétration de l'hormone est optimale après 60 minutes d'incubation et reste constante ensuite. Si le poids de tissu est de 25 mg par ml de milieu d'incubation contenant également

50 ng de testostérone-^{3}H, la captation de l'hormone par l'hypothalamus et le cerveau est progressive ; le taux de l'androgène intratissulaire augmentant régulièrement en fonction de la durée des incubations. HANSSON., étudiant la captation de la testostérone-^{3}H par des coupes de prostate, observe des résultats analogues qu'il attribue à un manque relatif d'hormone dans le milieu d'incubation ou au relargage d'enzymes protéolytiques dans ce milieu pouvant alors interférer avec la liaison hormone-protéine. Il conclut qu'il est nécessaire de définir des conditions d'incubation où le rapport $\frac{\text{tissu}}{\text{milieu}}$ soit constant et bas (130). BERTRAND et coll. ont étudié la captation de la testostérone-^{3}H, *in vitro*, par l'hypophyse, l'hypothalamus, le cortex cérébral et la prostate de rats castrés depuis 24 heures (131). La concentration en testostérone-^{3}H est de 3,4 mg par ml de milieu d'incubation, le poids de tissu est de 50 mg par ml de milieu. Le cortex cérébral et la prostate présentent une captation d'hormone optimale après 60 minutes d'incubation. Pour l'hypophyse et l'hypothalamus, la pénétration de l'hormone est encore croissante après 150 minutes d'incubation, ce qui indique une pénétration lente et une concentration hormonale en dessous de la saturation (131).

La castration n'a pas d'influence sur les modalités de la pénétration de la testostérone-^{3}H, *in vitro*, dans l'hypophyse, l'hypothalamus et le cerveau. Les courbes de pénétration de l'hormone présentent la même allure pour les organes de rats normaux et de rats castrés.

Lorsque des incubations de coupes d'organes de rats normaux ont été effectuées, la fixation de l'hormone par l'hypophyse est supérieure à celle des organes nerveux pendant la première heure de l'incubation. Elle reste ensuite constante jusqu'à la fin de l'incubation pour cette glande.

Par contre, la captation de la testostérone-^{3}H par l'hypothalamus et le cerveau continue à croître pendant les 180 minutes de l'incubation. On ne constate aucune différence dans la fixation de l'hormone entre l'hypothalamus et le cerveau.

Lorsque les rats sont castrés depuis 16, 21, 30 ou 60 jours, la captation de la testostérone-^{3}H est semblable pour l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau pendant la première heure d'incubation. Elle n'est pas supérieure à celle des organes de rats normaux.

Par contre, la castration accroît la fixation de l'hormone mâle par la glande hypophysaire après 120 minutes d'incubation lorsque les rats sont orchidectomisés depuis 3 ou 8 semaines. Pour cette durée d'incubation, la fixation de la testostérone-^{3}H, égale à $1,25.10^{-10}$ moles pour 100 mg de tissu hypophysaire, est augmentée de 51 % lorsque sont incubées des coupes d'hypophyse de rats castrés depuis 3 semaines. L'augmentation est de 34 % lorsque les animaux sont gonadectomisés depuis 2 mois. La captation est alors de $1,68.10^{-10}$ moles de testostérone pour 100 mg de tissu.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour les tissus nerveux. La captation de l'hormone mâle par l'hypothalamus et le cerveau de rats castrés depuis 3 semaines est identique, après 120 minutes d'incubation, à celledu rat normal. La fixation de testostérone-^{3}H par ces organes est cependant plus élevée après une orchidectomie de deux mois.

La gonadectomie a donc peu d'influence sur la pénétration et la fixation de la testostérone-^{3}H dans les coupes d'hypothalamus et de cerveau. Le seul écart significatif concerne l'hypophyse antérieure du rat castré depuis 3 semaines, qui, en 120 minutes, renferme un taux d'hormone mâle net-

tement supérieur à celui de l'hypophyse du rat normal et également de l'hypothalamus et du cortex cérébral.

Ces résultats semblent indiquer une pénétration active de la testostérone-^{3}H à travers la membrane cellulaire et un transport dynamique au sein de la cellule. Le rapport $\frac{\text{radioactivité par g de tissu}}{\text{radioactivité par ml de milieu}}$ est élevé. Ces chiffres pourraient suggérer qu'il ne s'agit pas d'un simple phénomène de diffusion de l'hormone dans la cellule mais d'un mécanisme de concentration intracellulaire, mettant en jeu des facteurs énergétiques.

L'effet de la température du milieu d'incubation a été étudié. Après incubation à 0°C, on constate une diminution de la captation de l'hormone. Lorsque les rats ont été orchidectomisés, cette diminution est de l'ordre de 50 % quelque soit l'organe étudié. Des résultats identiques sont obtenus pour l'hypothalamus et le cerveau de rats normaux. Par contre, la diminution de la captation de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure du rat normal est très faible, ce qui pourrait signifier une pénétration active plus importante dans l'hypophyse du rat castré. HANSSON a montré qu'après incubation de coupes de prostate à 0°C, en présence de testostérone-^{3}H, la rétention des androgènes est réduite de 73 % dans ce tissu (130). D'après cet auteur, l'activité enzymatique fortement réduite entraînerait une diminution de la transformation métabolique de la testostérone en dihydrotestostérone. KATO constate également une diminution de la captation de l'oestradiol-^{3}H dans différents tissus incubés à 0°C, pendant 30 ou 60 minutes (132). D'après ces résultats, la pénétration de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cerveau du rat castré ou normal pourrait être la résultante de deux mécanismes : un transport actif faisant appel à des facteurs énergétiques et un transport passif dû à une simple diffusion de l'hormone à travers la membrane.

Des incubations de coupes d'organes ont été effectuées en présence d'agents inhibiteurs du transport actif. Le 2,4-dinitrophénol, agent de découplage de la phosphorilation oxydative, inhibe le transport des acides aminés neutres dans la cellule (133). Il n'en est pas de même du passage de la testostérone-^{3}H dans des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral de rats normaux incubées pendant 120 minutes. Dans ces tissus, la pénétration de l'hormone mâle n'est pas modifiée par l'addition de 2,4-dinitrophénol au milieu d'incubation. MANGAN a étudié l'effet du 2,4-dinitrophénol sur la captation de la testostérone-^{3}H par les noyaux de prostate de rats normaux ou castrés. Il constate une réduction de 27 % de la fixation d'hormone par les noyaux de prostate de rats normaux et de 89 % par les noyaux de rats castrés (85).

L'A.T.P. ou l'A.M.P. cyclique, ajoutés au milieu d'incubation, produisent une augmentation de la captation de la testostérone-^{3}H par les coupes d'hypophyse antérieure mais restent sans effet sur la pénétration de l'hormone dans les tissus nerveux, hypothalamiques et cérébraux. L'énergie fournie par l'hydrolyse des molécules d'A.T.P. faciliterait la pénétration de l'androgène dans la glande pituitaire. Il semble que la présence d'A.T.P. ne soit pas requise pour la pénétration de la testostérone-^{3}H dans les centres nerveux supérieurs. Etudiant la captation de l'oestradiol-^{3}H par l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus de rates ovariectomisées, KATO constate que la fixation de l'hormone n'est pas modifiée de façon significative par l'addition d'A.T.P., de NADH et de NADPH (134).

D'après ces résultats obtenus après addition au milieu d'incubation de substances tels que le 2,4-dinitrophénol, l'A.T.P. ou l'A.M.P cyclique, il semble difficile d'établir une différence entre une pénétration active de

l'hormone dans la cellule et un simple phénomène d'échange-diffusion.

L'étude de la captation de la testostérone-^{3}H, en fonction de la concentration hormonale du milieu d'incubation, avait pour but de déterminer la capacité de fixation de l'hypophyse antérieure, de l'hypothalamus et du cerveau pour la testostérone-^{3}H. Le taux intratissulaire de l'hormone croît régulièrement, quelque soit l'organe, lorsque la concentration du milieu en testostérone-^{3}H est inférieure à $6,56.10^{-9}$ moles. Lorsque le milieu contient un taux d'hormone compris entre 6.10^{-9} moles et 19.10^{-9} moles en testostérone-^{3}H, la captation de l'hormone par l'hypophyse et les organes nerveux semble ralentie. Elle devient à nouveau croissante en fonction de la quantité d'hormone présente dans le milieu pour des concentrations de testostérone-^{3}H supérieures à 19.10^{-9} moles. Par contre, la fixation de testostérone-^{3}H par la prostate est toujours proportionnelle à la concentration en testostérone-^{3}H du milieu. Des résultats semblables ont été observés par BRUCHOWSKY (135).Etudiant la captation des androgènes dans la prostate de rat, cet auteur constate que le taux de stéroïde incorporé par le cytoplasme est proportionnel à la dose du stéroïde injecté. Il conclut à une diffusion passive des stéroïdes à travers la membrane cytoplasmique (135). De même, des résultats analogues ont été observés après perfusion de testostérone, de dihydrotestostérone et d'androstènedione dans des coupes de prostate humaine. L'accroissement de la captation est proportionnelle à l'augmentation de la concentration du stéroïde dans le milieu (136). Ces observations semblent exclure l'existence d'un mécanisme de transport actif qui pourrait être saturé et suggèrent plutôt un phénomène de simple diffusion (136).

Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus pour les oestrogènes. Après injection de doses croissantes d'oestradiol, KATO

démontre que la capacité de fixation de l'hypophyse et de l'hypothalamus antérieur est limitée pour cette hormone (137). Des résultats différents sont obtenus pour les organes cibles. La perfusion d'endomètre humain par des oestrogènes a montré qu'il n'y a pas de mécanisme saturable impliqué dans la pénétration de ces hormones dans le tissu (138). Des observations similaires ont été faites *in vivo* (11).

Ces résultats ne permettent cependant pas d'exclure la présence de récepteurs hypophysaires ou hypothalamiques dont la saturation n'est pas mesurable dans les expériences effectuées. Des études autoradiographiques, effectuées très récemment par STUMPF, ont montré une concentration exclusive de la testostérone-^{3}H dans les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure (139). Les protéines réceptrices de la testostérone-^{3}H localisées dans ces cellules ne doivent représenter qu'un taux très faible des protéines totales hypophysaires. De ce fait, la saturation de ces récepteurs doit être masquée par la présence de protéines aspécifiques.

L'ensemble de ces résultats confirment ceux qui avaient été observés *in vivo*. La captation de l'hormone mâle *in vitro* est plus lente et plus progressive qu'après administration directe à l'animal. L'hypophyse antérieure semble également avoir, *in vitro*, un comportement différent de celui des centres nerveux. La castration augmente la capacité de fixation de cette glande pour la testostérone-^{3}H, mais a peu d'influence sur l'hypothalamus et le cerveau. Ces deux organes ne se différencient pas, ce qui avait également été observé *in vivo*.

Les études effectuées pour étudier le passage de la testostérone-^{3}H à travers la membrane ne permettent pas d'établir une différence entre un transport actif et un processus d'échange-diffusion de l'hormone.

CHAPITRE 3

MISE EN EVIDENCE D'ASSOCIATIONS MACROMOLECULAIRES DES ANDROGENES DANS LE CYTOPLASME DE L'HYPOPHYSE ANTERIEURE DU RAT MALE.

ETUDE DE LEUR SPECIFICITE

S O M M A I R E

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1 - Testostérone-^{3}H et dihydrotestostérone-^{3}H

2 - Animaux

3 - Injections

4 - Préparation des tissus et méthodes d'incubation

a) Homogénats

b) Coupes

c) Cytosols

d) Microsomes

5 - Chromatographies sur gels

a) Sephadex G 25

b) Sephadex G 100, G 200

6 - Extraction des stéroïdes et analyse chromatographique

7 - Méthodes de dosages

a) Protéines

b) Radioactivité

8 - Expression des résultats

II - RESULTATS

1 - Mise en évidence d'une association macromoléculaire soluble des androgènes dans le cytoplasme de l'hypophyse et de l'hypothalamus du rat mâle normal

a) *In vitro*

b) *In vivo*

2 - Variations de l'association macromoléculaire des androgènes dans l'hypophyse et l'hypothalamus du rat normal et castré

a) *in vitro*

α) Influence de la température du milieu d'incubation

β) Influence de la durée de l'incubation

b) *in vivo*

α) Influence de la gonadectomie sur l'association macromoléculaire des androgènes de l'hypophyse

β) Evolution de l'association macromoléculaire des androgènes de l'hypophyse en fonction du temps

3 - Etude de l'association macromoléculaire des androgènes dans l'hypophyse antérieure

a) Nature de la macromolécule

b) Comportement de l'association macromoléculaire sur Sephadex G 100 et G 200

c) Etude de la nature des androgènes liés aux macromolécules de l'hypophyse et comparaison avec l'hypothalamus, la prostate, le cortex cérébral et le muscle

α) Métabolisme de la testostérone-^{3}H, *in vitro*

β) Métabolisme, *in vivo*, de la testostérone-^{3}H dans le cytosol d'hypophyse du rat normal et castré

4 - Détermination de l'activité de la 5α-reductase dans les microsomes d'hypophyses de rats normaux et castrés

5 - Détermination, à l'équilibre, de l'affinité et de la spécificité de la liaison de la dihydrotestostérone et de la testostérone dans le cytosol hypophysaire

a) DHT

α) Liaison, à l'équilibre, de l'hormone

β) Détermination de la constante d'association de l'hormone

γ) Détermination, par compétition, de la spécificité de la liaison de la dihydrotestostérone

b) Testostérone

α) Liaison, à l'équilibre, de l'hormone

β) Détermination de la constante d'association de l'hormone

γ) Détermination de la dissociation de la liaison de la testostérone-^{3}H durant la filtration sur gel de Sephadex G 25 medium

δ) Détermination, par compétition, de la spécificité de la liaison de la testostérone

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS.

INTRODUCTION

Nous avons étudié préalablement les modalités de la pénétration et de l'accumulation, *in vivo* et *in vitro*, de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cortex cérébral du rat normal et castré. Les résultats obtenus nous ont permis de constater une captation rapide et importante de cet androgène par les trois organes. Cependant la captation et la rétention semblent particulièrement importantes pour la glande hypophysaire, les deux organes nerveux ne présentant pas de différences significatives. Il nous a paru intéressant de rechercher la présence de molécules réceptrices de la testostérone ou de ses métabolites, susceptibles de jouer un rôle dans le mécanisme de son intervention dans ces organes. L'existence de macromolécules liant l'oestradiol dans l'hypothalamus de la rate a été démontré (107, 140). D'autres auteurs ont caractérisé des structures semblables dans les organes cibles des androgènes (64, 77, 79).

Nos recherches ont donc eu pour but de montrer l'existence d'associations macromoléculaires des androgènes dans l'hypophyse et l'hypothalamus du rat normal et castré, *in vivo* et *in vitro*. Nous avons ensuite essayé de caractériser l'association macromoléculaire de la testostérone dans l'hypophyse en étudiant la nature de la molécule réceptrice, son comportement sur Sephadex G 100, G 200, la nature des androgènes liés à cette macromolécule. Puis nous avons déterminé l'affinité et la spécificité de la liaison de la testostérone et de son principal métabolite, la dihydrotestostérone, dans le cytosol hypophysaire.

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES -

1 - Testostérone-^{3}H et Dihydrotestostérone-^{3}H

Fournie par le C.E.N., la testostérone-^{3}H possède une activité spécifique de 42 ou 46 Ci/mM. La solution benzène-méthanol (9/1) initiale est évaporée sous vide. Le résidu est repris par 5 ml d'éthanol absolu. Cette solution mère est ensuite diluée dans une solution de NaCl à 9 0/00 pour les expériences *in vivo* ou dans une solution tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, pour les études réalisées *in vitro*, la proportion d'alcool n'excédant pas 0,4 %.

La dihydrotestostérone-^{3}H (DHT-^{3}H), d'activité spécifique 43 Ci/mM, est fournie par le C.E.N. et préparée dans les mêmes conditions. La pureté de ces deux composés est vérifiée régulièrement par chromatographie dans le système de Kochakian et coll. (141).

2 - Animaux

Les expériences sont généralement effectuées avec des rats mâles, normaux ou orchidectomisés, d'un âge moyen de 75-80 jours. Pour les études à l'équilibre, des lots de 20 à 30 rats prépubères de 36 jours sont utilisés. Tous les animaux sont sacrifiés par décapitation sans anesthésie, au moyen d'une guillotine (Havard Apparatus)

3 - Injections

a) Intra-carotidiennes

Des lots de 3 à 5 rats adultes sont utilisés. Les injections sont faites dans la carotide primitive, au moyen d'un cathéter épicranien,

après dénudation de l'artère. Les rats sont préalablement anesthésiés par injection intra-péritonéale de 1 ml de Nembutal (Ethyl-méthyl-butyl-barbiturate de sodium) en solution à 2 % dans du sérum physiologique. Chaque rat reçoit 500 ng d'hormone mâle, soit 100 µl d'une solution de testostérone-^{3}H, obtenue par dilution de la solution mère éthanolique. Les rats sont sacrifiés 5 minutes après l'injection.

b) Intra-péritonéales

Des lots de 8 à 12 rats adultes, normaux ou castrés 10 ou 15 jours auparavant, sont constitués. L'hormone mâle est administrée par voie péritonéale à chaque animal qui reçoit 200 ng d'une solution de testostérone-^{3}H . Le volume injecté est de 200 µl. Les animaux sont sacrifiés à des temps variables après l'injection.

4 - Préparation des tissus et méthodes d'incubation

Après décapitation, les hypophyses antérieures et les hypothalamus sont rapidement prélevés et pesés à l'aide d'une balance Mettler type H 16.

a) Homogénats

Les organes de 3 rats adultes normaux ou castrés depuis 10 jours sont homogénéisés, à froid, à l'aide d'un appareil de Potter, dans 2 ml d'une solution tampon phosphate 0,05 M (Na_2HPO_4, 0,05 M-KH_2PO_4,0,05 M) de pH 7,4. Le Potter est rincé ensuite par 1 ml de solution tampon. Dix coups de piston, à une vitesse de 1 000 tours/minute, sont nécessaires pour obtenir un broyage suffisant. Après filtration sur gaze,les homogénats sont mis à incuber en présence de $3,5.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, pendant 30 minutes, à 37°C, 25°C ou 0°C. Ils sont ensuite centrifugés à 800 g, pendant 10 minutes, à 4°C (centrifugeuse Chris). Après décantation, une fraction aliquote est prélevée pour déterminer radioactivité et protéines

dans le surnageant qui est, ensuite, soumis à une filtration sur colonne de gel de Sephadex G 25 fine, équilibrée dans la solution tamponphosphate 0,05 M.

b) Coupes

Les coupes de 4 organes de rats, normaux ou castrés depuis 40 jours, sont mises à incuber dans des fioles contenant 3 ml de solution de Krebs pH 7,5, renfermant de 1 à $3,5.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H. Les incubations sont effectuées en atmosphère d'oxygène, sous agitation constante, à des températures et des temps variables. A la fin de la période d'incubation, les coupes sont extraites du milieu de survie et lavées deux fois par 2 ml de Krebs froid. Elles sont broyées au potter dans 2 ml de solution tampon phosphate 0,05 M. Le piston est rincé par 1 ml de cette solution. Les homogénats sont centrifugés à 800 g pendant 10 minutes. Une fraction est prélevée pour doser protéines et radioactivité et le surnageant est filtré sur colonne de gel de Sephadex G 25 fine- solution tampon phosphate.

c) Cytosols

Les organes de 4 rats normaux adultes sont homogénéisés dans lesmêmes conditions que précédemment. Après une centrifugation de l'homogénat à 800 g, pendant 10 minutes, le surnageant est complété à 5 ml avec une solution tampon phosphate et centrifugé, pendant 60 minutes, à 105.000 g dans le rotor SW 50 d'une centrifugeuse L_4 Beckman, à 4°C. Le surnageant 105.000 g obtenu ou cytosol est incubé en présence de concentrations variables de testostérone-^{3}H et à différentes températures. Il est ensuite chromatographié sur colonnes de gels de Sephadex G 25 fine, G 100 ou G 200, équilibrés dans la solution tampon phosphate.

Des cytosols ont été préparés, de la même manière, à partir d'organes de rats, ayant reçu une injection intra-carotidienne ou intra-

péritonéale d'androgène ou incubés en présence de testostérone-^{3}H selon le protocole indiqué précédemment.

- Action de la trypsine : Le cytosol (5 ml) provenant d'une incubation de coupes d'hypophyses de rats normaux adultes, pendant 30 minutes, à 25°C, en présence de $1,9.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H est divisé en deux fractions. A l'un de ces extraits, sont ajoutés 250 µg de trypsine dissous dans 100 µl de solution tampon phosphate. L'autre fraction est additionnée de 100 µl de tampon phosphate. Les deux extraits sont incubés pendant 15 minutes à 37°C, puis filtrés sur colonne de Sephadex G 25 fine. Les protéines et la radioactivité sont dosées ensuite.

- Etude à l'équilibre : 20 à 30 hypophyses de rats prépubères sont lavées avec une solution tampon phosphate puis homogénéisées au Potter de Kontes, dans un volume de 500 µl de tampon phosphate. Vingt coups de piston à la vitesse de 1 000 tours/minute donnent une bonne homogénéisation. L'homogénat est centrifugé, à 4°C, 6 minutes à 1000 g, puis 60 minutes à 105.000 g dans le rotor S W 50, muni de réducteurs. A la fin de la centrifugation, la concentration en protéines du cytosol est déterminée par la méthode de LOWRY coll. sur une fraction aliquote (5 µP x 2)(142).

Dans une première série d'expériences, le cytosol, dilué avec la solution tampon pour obtenir une concentration de 2 920 µg de protéines par ml, est incubé en présence d'une quantité fixe de DHT-^{3}H ($2,4.10^{-8}$ M) ou de testostérone-^{3}H à 0°C. Des portions aliquotes de 150 µP chacune sont prélevées à des intervalles de temps allant de 30 minutes à 22 heures et filtrées sur des colonnes de Séphadex G 25 medium. La radioactivité et les protéines sont ensuite déterminées dans les éluats.

Dans une deuxième série d'expériences, des fractions de cytosol (150 ou 300 µl) contenant une concentration en protéines identique (2 920 µg/ml) sont incubées, à l'équilibre et à 0°C, en présence de doses croissantes de testostérone-^{3}H allant de 10^{-9} à 10^{-6} M ou de

DHT-^{3}H (10^{-10} à 10^{-7} M). Elles sont ensuite chromatographiées sur colonnes de Sephadex G 25 medium. Les protéines et la radioactivité sont ensuite dosées dans les fractions éluées.

Dans un troisième type d'expériences, des fractions de cytosol, contenant 2 920 µg de protéines par ml, sont incubées, à l'équilibre et à 0°C, avec $4,4.10^{-9}$ M de testostérone-^{3}H ou $2,2.10^{-9}$ M de dihydrotestostérone-^{3}H, en l'absence ou en présence de compétiteurs non marqués, à une concentration 100 fois plus élevée ($2,2.10^{-7}$ M ou $4,4.10^{-7}$ M). Les compétiteurs utilisés sont : la testostérone, (17β-hydroxy-4-androstène-3-one); la dihydrotestostérone, (DHT) [17β-hydroxy-5α-androstane-3-one], le 5α-androstane, 3α, 17β-diol, le 5α-androstane, 3β, 17β-diol, l'androstènedione, [Δ_4-androstène-3,17-dione], la progestérone, [4-prégnene-3,20-dione], l'oestradiol-17α, [1,3,5 (10)-oestratriène-3,17α-diol], l'oestradiol-17β, [1,3,5,(10)-oestratriène-3,17β-diol], la corticostérone (11β, 21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione).

Les résultats sont exprimés selon la formule suivante qui permet de définir le pourcentage d'efficacité de la compétition (143) :

$$\frac{\text{Radioactivité liée avec la DHT-}^{3}H - \text{Radioactivité liée avec la DHT-}^{3}H \text{ et le compétiteur}}{\text{Radioactivité liée avec la DHT-}^{3}H - \text{Radioactivité liée avec la DHT-}^{3}H \text{ et DHT non marquée}} \times 100$$

La même expression est utilisée pour la testostérone-^{3}H

d) Incubations de microsomes

Les hypophyses antérieures de 4 rats adultes normaux ou orchidectomisés depuis 1 mois sont broyées dans 10 volumes de tampon phosphate, de pH 6,5, contenant 1 mMole de KH_2PO_4, 1 mMole de $MgCl_2$ et du sucrose 0,32 M. Les microsomes sont ensuite isolés selon la technique

de F. ROMMERTS et J. VAN DER MOLEN (144). Toutes les opérations sont effectuées à froid. L'homogénat initial est centrifugé à 900 g pendant 10 minutes. Le surnageant S_I obtenu est décanté et le culot est repris par un volume de tampon égal à la moitié de celui utilisé pour l'homogénéisation. Après remise en suspension et centrifugation à 900 g, on obtient un surnageant S_{II}. Les fractions S_I et S_{II} réunies sont centrifugées, à 4°C et à 17.000 g,pendant 20 minutes afin de sédimenter la fraction mitochondriale. Le surnageant S_{III} issu de cette centrifugation est soumis pendant 1 heure à une accélération de 105.000 g dans un rotor S W 50 (Beckman). Le culot microsomial, isolé après décantation du surnageant, est remis en suspension dans 0,5 ml de sucrose 0,32 M contenant 33 mM de glucose, 6, phosphate, 460 mU/ml de glucose-6-phosphate deshydrogénase 3,3 mM de NADP et $2,4.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H. L'incubation est effectuée à 37°C, pendant 1 heure, à l'air libre. A la fin du temps d'incubation, le tube d'incubation est transféré à 0°C et 4 ml de sucrose 0,32 M sont ajoutés au milieu qui est centrifugé,pendant 60 minutes, à 105.000 g afin d'obtenir un culot de microsomes et un surnageant. La radioactivité de ces deux fractions est analysée séparément, les protéines sont dosées ensuite.

5 - Chromatographies sur gels de Sephadex

a) Sephadex G 25

Les extraits hypophysaires et hypothalamiques, obtenus après incubations, broyages et centrifugations, sont chromatographiés sur des colonnes de gel de Sephadex G. 25 fine ou medium, équilibré dans une solution tampon phosphate 0,05 M, de pH 7,4. Les colonnes (Pharmacia, type K 9/30 ou K 15/30) renferment 5 ou 10 g de gel. Le gel est mis à gonfler dans un excès de solution tampon phosphate 0,05 M pendant 5 heures,

puis lavé plusieurs fois avant d'être introduit dans la colonne. Un volume de solution tampon égal à 2 ou 3 fois le volume de la colonne est utilisé pour le lavage et le tassement du gel. Les colonnes ont une hauteur de 27 cm et un diamètre de 0,9 ou 1,5 cm. Le débit est de 30 ml/heure pour le Sephadex G 25 fine et de 120 ml/heure pour le G 25 medium. L'homogénéité du gel et le volume d'exclusion sont contrôlés par filtration de Bleu Dextran 2 000 (Pharmacia) dissous dans la solution tampon phosphate. Le passage de la testostérone-^{3}H est également déterminé. Le volume d'exclusion est de 8 ml pour les colonnes ayant un diamètre de 0,9 cm et de 18 ml pour celles dont le diamètre est de 1,5 cm. De même, l'hormone libre est éluée entre le 23ème et le 35ème ml dans le premier type de colonne, et entre le 56ème et 84ème ml dans le second. Les élutions sont toutes réalisées à l'aide de solution tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4. Les éluats sont collectés par fractions de 2 ml pour le Sephadex G 25 fine et de 1,5 ml pour le Sephadex G 25 medium. Protéines et radioactivité sont ensuite dosées. Toutes ces manipulations sont effectuées en chambre froide entre 5 et 7°C.

b) Sephadex G 100, G 200

Les cytosols hypophysaires sont chromatographiés sur des colonnes de gel de Sephadex G 100, G 200, soit directement, soit après élimination de l'hormone libre par séparation sur Sephadex G 25 fine.

α) Préparation des gels

Le Sephadex est mis à gonfler pendant trois jours dans un large excès de solution tampon phosphate (environ 2 litres). Une agitation magnétique très lente est maintenue pendant toute cette période. L'excès de solution est ensuite décanté et le gel lavé 5 à 6 fois par de nouvelles quantités de cette solution. On laisse le gel reposer 1 à 2 jours. La solution tampon en excès est à nouveau éliminée et le volume du gel

mesuré dans une éprouvette graduée. Le gel est alors mélangé à une quantité de solution tampon égale à la moitié de son volume. Cette suspension est versée, à l'aide d'une tige de verre, dans la colonne qui contient de la solution tampon, introduite par le tube capillaire de sortie, sur une hauteur de 2 à 3 cm. L'orifice de sortie de l'éluant est ouvert 20 minutes plus tard, la pression ne devant pas excéder 1 à 2 cm. Au fur et à mesure du dépôt du gel, la pression de travail est peu à peu atteinte. Le gel est ensuite lavé par 2 à 3 fois son volume de solution tampon phosphate.

Un adaptateur d'échantillon est placé à la surface du gel de Sephadex G 100. Pour faciliter les dépôts sur le Sephadex G 200, une couche de Sephadex G 25 coarse de 0,5 cm d'épaisseur est déposée à la surface du gel. Le volume de l'échantillon ne doit pas être supérieur à 1 % du volume total du gel.

β) Caractéristiques des colonnes de gels

L'éluant utilisé est toujours la solution tampon phosphate 0,05 M, de pH 7,4. Les colonnes sont maintenues en permanence à la température de 8°C. Les caractéristiques des différentes colonnes sont définies dans le tableau suivant :

Caractéristiques des colonnes de gels de Sephadex G 100, G 200

Qualité du gel	Diamètre de la colonne	Hauteur de la colonne	Volume du gel	Pression	Débit par heure
Sephadex G 100 superfine	2,5 cm	38 cm	186 ml		19ml/heure
G 200	1,5 cm	80 cm	141 ml	7-8 cm	7ml/heure

γ) Etalonnage

Le passage d'une solution de Bleu Dextran 2 000 permet de contrôler l'homogénéité du gel et de déterminer le volume d'exclusion de la colonne. Différentes protéines en solution dans le tampon phosphate (1 mg/ml) sont utilisées pour étalonner les gels : Sérum-albumine de boeuf monomère et dimère, ovalbumine, hémoglobine, trypsine et myoglobine. Le volume d'élution de la testostérone-^3H est également déterminé.

Les résultats sont ensuite exprimés en termes de K_{av}, paramètre établi par LAURENT et KILLANDER (145). Ce paramètre est défini comme suit :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

où V_e est le volume d'élution de la substance étudiée, V_o le volume vide de la colonne (V_e du Bleu Dextran) et V_t le volume total du lit du gel. Dans les représentations graphiques, on porte K_{av} en fonction du log du poids moléculaire des différentes substances étudiées.

6 - Extraction des stéroïdes et analyse chromatographique

- *Eluats Sephadex G 25*

Après séparation sur gel de Sephadex G 25, les stéroïdes élués avec les protéines sont extraits suivant la méthode de FOLCH et coll. (146), modifiée par ERLICHOWSKY et WILSON (68). Les fractions exclues sur G 25 sont agitées avec un volume 5 fois plus important de chloroforme-méthanol (2/1). Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 5 000 t/minute dans une centrifugeuse Chris réfrigérée. La phase aqueuse supérieure est décantée et la phase inférieure est agitée avec un volume de chloroforme-méthanol-eau (3/48/47) égal au volume de phase aqueuse éliminée.

Après centrifugation, la phase aqueuse est à nouveau décantée. L'opération est répétée deux fois. La phase organique chloroforme-méthanol est séchée sous vide et remise en suspension dans 100 µl de méthanol. Une fraction aliquote (2 x 5 µl) est prélevée pour comptage de la radioactivité et une autre pour l'analyse chromatographique sur papier.

Les fractions correspondant au passage de l'hormone libre après chromatographie sur G 25 sont extraites trois fois par l'éther éthylique dans une ampoule à décanter. Les phases éthérées réunies sont évaporées sous vide et reprises par du méthanol. Le comptage de la radioactivité et l'analyse chromatographique sont ensuite effectués sur des parties aliquotes.

- *Microsomes*

Le culot de microsomes est extrait trois fois par 4 ml d'éthanol-éther (1/1). Le surnageant (milieu d'incubation) est extrait trois fois par 10 ml d'éther, sous agitation magnétique. Les extraits sont évaporés sous vide et chromatographiés sur papier.

- *Chromatographie*

Les androgènes sont généralement séparés par chromatographie descendante sur papier, dans le système de KOCHAKIAN et STIDWORTHY (141). Le solvant est du benzène-cyclohexane (1/1) saturé en propylène glycol. Le papier est imprégné de propylène-glycol-méthanol (1/1). Les extraits sont additionnés de testostérone (25 µg) et d'androstènedione (25 µg) comme étalons internes et déposés sur papier Whatman n° 2 découpé en bandelettes de 2,5 cm de largeur et de 49 cm de longueur. Des stéroïdes témoins migrent parallèlement : le 3α-androstanediol, la testostérone, la dihydrotestostérone, la Δ_4-androstènedione et l'androstanedione. La durée de la chromatographie est d'environ 5 heures, à 30°C.

Des chromatographies dans le système de KOWARSKI et coll. sont également effectuées sur papier Whatman n° 2, à température ordinaire (147). Le solvant est composé de méthanol-eau-hexane (9,1,10). La durée de la chromatographie est d'environ 4 heures.

Après développement des chromatogrammes et examen à 240 nm des étalons internes, les bandelettes sont découpées cm par cm et la radioactivité mesurée par scintillation liquide. L'androstanediol témoin est révélé par l'acide phosphomolybdique à 4 % dans l'alcool absolu. Les autres stéroïdes témoins sont révélés par le réactif de Zimmerman (148). Les bandelettes sont trempées dans une solution de 1,3-dinitrobenzène à 2,5 % dans l'alcool absolu, séchées à l'aide de papier filtre, puis plongées dans une solution de potasse à 14 % dans l'alcool. Elles sont ensuite séchées à 40°C. On observe la formation de colorations bleu-violacées.

7 - Méthodes de dosage

a) Protéines

Le matériel utilisé pour ce dosage est nettoyé préalablement au mélange sulfochromique. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry (142) en utilisant une solution de sérum-albumine de boeuf comme substance de référence (fractions V,N.B.C.,USA).

- *Eluats de colonnes*

Après filtration des extraits sur colonne, les protéines sont dosées dans les éluats. Des fractions de 100 ou 200 µl sont nécessaires selon la quantité de protéines déposées.

- *Microsomes*

Le culot protéique resédimenté après extraction de la radioactivité est dissous dans la NaOH N à 37°C pendant 1 heure. Les protéines sont dosées sur des fractions aliquotes de 100 µl.

b) Radioactivité

La radioactivité, en milieu aqueux, est comptée après addition de 5 ou 10 ml de mélange de Bray (149) dont la composition est la suivante : PPO 5 g, diméthyl PoPoP 0,2 g, naphtalène 60 g, méthanol 100 ml, éthylène glycol 20 ml, dioxanne q.s.p. 1 000 ml.

Les culots de centrifugation sont digérés par du N.C.S et comptés après addition de 10 ml de toluène scintillant.

La radioactivité des bandelettes de papier est déterminée après addition de 5 ml d'un mélange contenant : PPO 5g, diméthyl PoPoP 0,1 g, toluène q.s.p. 1 000 ml.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur du type Mark I ou Isocap 300 (Nuclear Chicago). Les corrections de quenching sont faites suivant la méthode du rapport des canaux avec standard externe.

8 - Expression des résultats

Après chromatographie sur colonnes de gels de Sephadex, les résultats sont exprimés en Activité spécifique, ie ng ou pg ou moles par mg de protéines. L'activité spécifique est calculée sur chaque fraction protéique éluée et la moyenne est effectuée.

Les résultats présentés dans les tableaux correspondent à des moyennes de 3 à 5 expériences.

Les écarts standards à la moyenne sont calculés selon la formule :

$$\sigma_M = \sqrt{\frac{\varepsilon d^2}{N(N-1)}}$$

II - RESULTATS

1 - Mise en évidence d'une association macromoléculaire soluble des androgènes dans l'hypophyse et l'hypothalamus du rat normal

a) In vitro

Une association macromoléculaire des androgènes peut être mise en évidence par différentes techniques d'incubation *in vitro*.

La chromatographie sur gel de Sephadex G 25 fine de surnageants 800 g, obtenus après centrifugation d'homogénats d'hypophyse et d'hypothalamus de rats normaux, incubés à 25°C pendant 30 minutes, montre le passage simultané des protéines et d'une partie de la radioactivité, ce qui permet de penser à une association macromoléculaire soluble de l'androgène (Figure 15 A, Tableau XXI). La figure 15 A montre que la radioactivité hypophysaire est séparée en 2 fractions : la première, correspondant à la fraction protéique, est éluée du 6ème au 12ème ml ; la seconde, coïncidant avec le passage de l'hormone libre, est éluée du 12ème au 38ème ml. La quantité d'hormone liée est en moyenne de $1,94.10^{-13}$ moles par mg de protéines hypophysaires (Tableau XXI). Des résultats comparables sont obtenus pour l'hypothalamus (Figure 15 B, Tableau XXI). L'élution du premier pic de radioactivité se fait en même temps que celle des protéines. L'hormone libre est éluée ensuite. La quantité d'androgène liée par mg de protéines hypothalamiques est, en moyenne, de $0,55.10^{-13}$ moles (Tableau XXI).

La présence de cette association macromoléculaire soluble hypophysaire et hypothalamique peut être également démontrée par filtration sur gel de Sephadex G 25 fine de surnageants 800 g, préparés après incubation de coupes de ces organes, à 25°C, pendant 30 minutes (Figures 15 C et D).

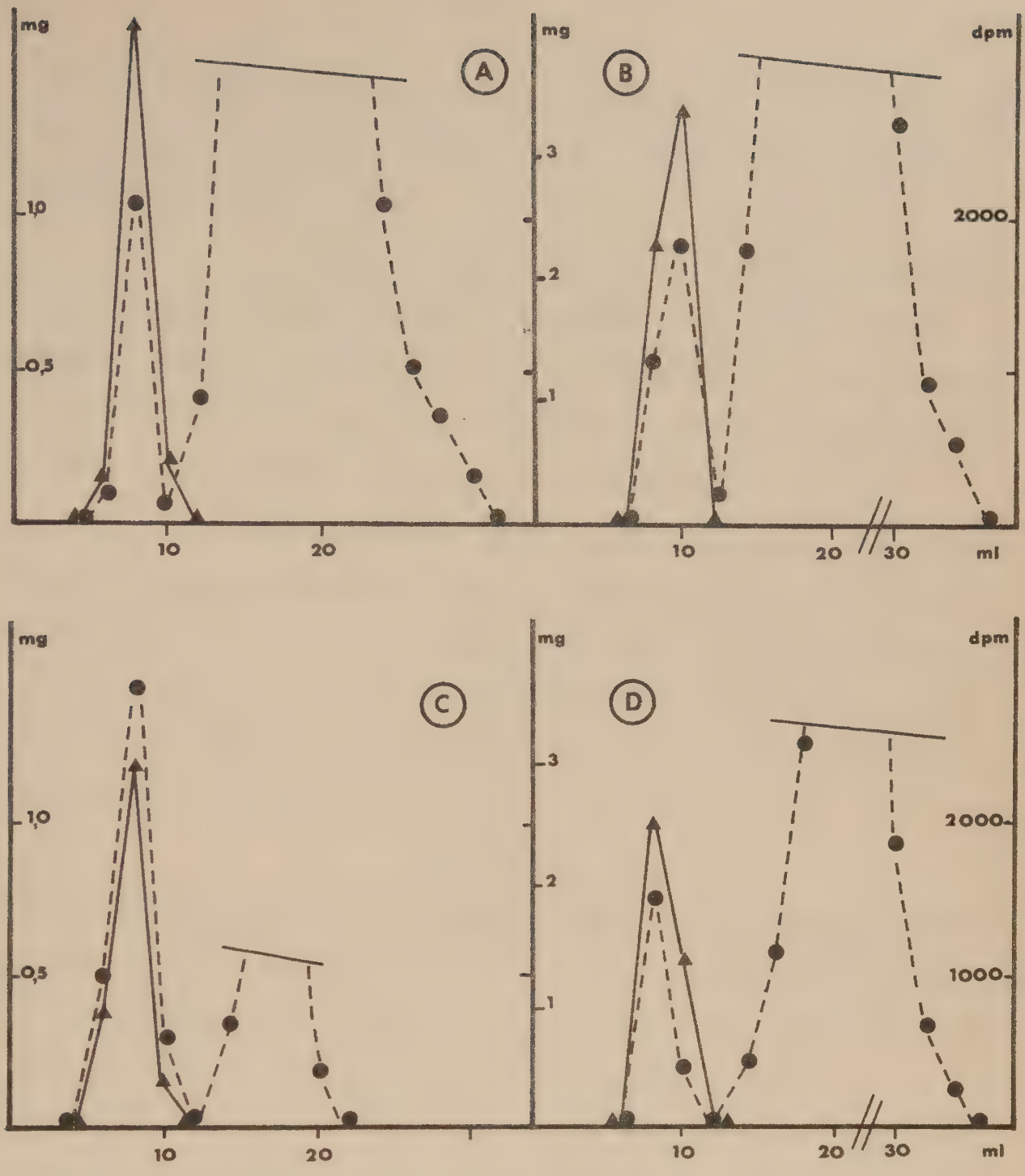


Fig. 15 - Chromatographies sur gel de Sephadex G 25 fine de surnageants 800 g préparés par incubation d'homogénats d'hypophyse (A) ou d'hypothalamus (B), et de coupes d'hypophyse (C) ou d'hypothalamus (D), en présence de testostérone-^{3}H.

- Ordonnées : - A gauche, taux de protéines en mg par ml d'éluat
  - A droite, dpm par ml d'éluat
- Abscisses : - Fractions éluées en ml

  En trait plein : Elution de protéines

  En pointillé : Elution de la radioactivité.

tableau XXI). Le taux d'hormone lié est, en moyenne, de $0,83.10^{-13}$ moles par mg de protéines hypophysaires et de $0,39 \cdot 10^{-13}$ moles par mg de protéines hypothalamiques (Tableau XXI).

Cette liaison macromoléculaire de l'androgène aux protéines hypophysaires et hypothalamiques est également présente dans le cytosol préparé à partir de coupes de ces organes incubées à 25°C. Le taux d'hormone lié est de $0,43.10^{-13}$ moles par mg de protéines d'hypophyse et de $0,032.10^{-13}$ moles par mg de protéines d'hypothalamus (Tableau XXI).

L'existence d'une liaison cytoplasmique soluble dans l'hypophyse et l'hypothalamus du rat normal est confirmée par analyse sur gel de Sephadex G 25 fine de cytosols incubés directement en présence de testostérone-^{3}H (Tableau XXI). L'activité spécifique est de $3,2.10^{-13}$ moles par mg de protéines hypophysaires et de $0,83.10^{-13}$ moles par mg de protéines hypothalamiques.

TABLEAU XXI

Mise en évidence d'associations macromoléculaires des androgènes par chromatographie sur gel de Sephadex G 25 fine de fractions subcellulaires d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux, provenant d'incubations effectuées en présence de testostérone-^{3}H, pendant 30 minutes, à 25°C.

Résultats : L'activité spécifique est exprimée en moles par mg de protéines.

Fraction incubée	Fraction déposée sur G-25	Concentration en testostérone-^{3}H	Activité spécifique	
			Hypophysaire	Hypothalamique
Homogénat	S. 800 g	$3,5.10^{-8}$ M	$1,94.10^{-13}$	$0,55.10^{-13}$
Coupes	S. 800 g	$3,5.10^{-8}$ M	$0,83.10^{-13}$	$0,39.10^{-13}$
Coupes	S. 800 g	$1,0.10^{-8}$ M	$0,20.10^{-13}$	$0,036.10^{-13}$
Coupes	S.105.000 g	$1,0.10^{-8}$ M	$0,43.10^{-13}$	$0,032.10^{-13}$
Cytosol	S.105.000 g	$1,4.10^{-8}$ M	$3,2.10^{-13}$	$0,83.10^{-13}$

L'incubation directe des homogénats et des cytosols avec la testostérone-^{3}H assure une augmentation de la capacité de fixation des protéines (Tableau XXI). L'activité spécifique par mg de protéines est supérieure à celle obtenue après incubation de coupes de ces organes. Cette différence pourrait être due à des phénomènes de perméabilité membranaire.

D'après ces résultats, il semble que la capacité de fixation des androgènes soit plus élevée pour l'hypophyse que pour l'hypothalamus (Tableau XXI). Les valeurs obtenues ne peuvent pas être comparées, ces organes ayant des poids et des taux de protéines différents.

b) In vivo

La présence d'associations macromoléculaires solubles des androgènes dans l'hypophyse et l'hypothalamus a été confirmée par injection de testostérone-^{3}H à des rats normaux. Deux modes d'injection ont été utilisés: voie intra-carotidienne (I.C.) et voie intra-péritonéale (I.P.).

TABLEAU XXII

Mise en évidence d'associations macromoléculaires des androgènes par filtration, sur gel de Sephadex G 25, de fractions subcellulaires hypophysaires et hypothalamiques après injection de l'hormone à des rats normaux.

Résultats exprimés en moles par mg de protéines.

Voie d'injection	Testostérone-^{3}H injectée par rat	Fraction déposée sur G 25	Activités spécifiques	
			Hypophyse	Hypothalamus
I.C.	466 ng	S. 800 g	$0,06.10^{-13}$	$0,06.10^{-13}$
I.P.	77 ng	S. 105.000 g	$0,010.10^{-13}$	$0,046.10^{-13}$
I.P.	200 ng	S. 105.000 g	$0,019.10^{-13}$	

Quelque soit la voie d'administration de l'hormone, la

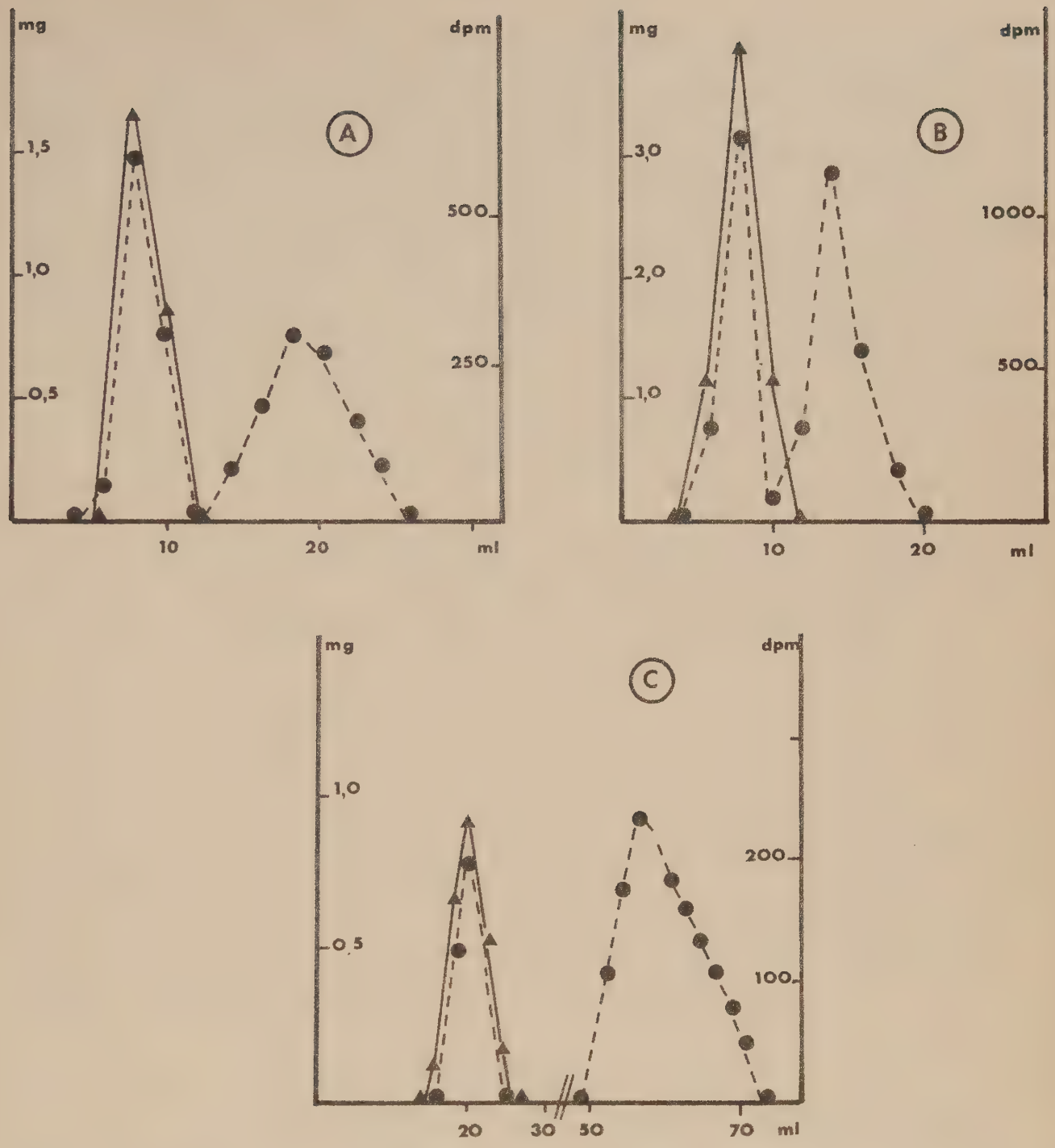


Fig. 16 - Chromatographies sur gel de Sephadex G 25 fine de surnageants 800 g d'hypophyse (A) ou d'hypothalamus (B) de rats normaux après injection I.C. de testostérone-^{3}H, et de cytosols d'hypophyse (C) de rats normaux après injection de cette hormone.

- Ordonnées: - A gauche, taux de protéines en mg par ml d'éluat
  - A droite, dpm par ml d'éluat
- Abscisses: - Fractions éluées en ml

En trait plein : Elution de protéines

En pointillé : Elution de la radioactivité.

chromatographie sur Sephadex G 25 fine de surnageants 800 g ou 105.000 g permet d'observer, dans la fraction exclue, une similitude de passage entre les protéines et la radioactivité (Figure 16). La figure montre que, 5 minutes après l'injection intra-carotidienne de la testostérone-^{3}H, la quantité d'hormone libre est faible et n'excède pas 50 % pour les deux organes. Dans certaines expériences, toute la radioactivité était détectée dans le pic exclu. Par contre, cinq minutes après l'injection I.P. de l'androgène, on constate un taux d'hormone libre hypophysaire important puisque seulement 10 à 15 % de la radioactivité sont associés aux protéines (Figure 16).

2 - Variations de l'association macromoléculaire de l'androgène dans l'hypophyse et l'hypothalamus du rat normal et castré

a) In vitro

α) Effets de la température du milieu d'incubation

Des homogénats, des coupes d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux et castrés depuis 40 jours sont incubés, pendant 30 minutes, à 37°C, 25°C et 0°C. Après chromatographie sur gel de Séphadex G 25, l'activité spécifique de la fraction soluble est mesurée.

- Influence sur le taux d'hormone lié

- Incubation d'homogénats. L'incubation d'homogénats d'hypophyses antérieures et d'hypothalamus à des températures variables, en présence de testostérone-^{3}H ($3,5.10^{-8}$ M), montre que le taux de l'association macromoléculaire décroît avec l'élévation de la température (Tableau XXIII). Pour la glande pituitaire de rats normaux, le taux d'androgène lié par mg de protéines est de $2,32.10^{-13}$ moles, de $1,94.10^{-13}$ moles et de $1,16;10^{-13}$ moles respectivement à 0°C, 25°C et 37°C (Tableau XXIII). Lorsque des homogénats d'hypophyses de rats castrés sont incubés dans les mêmes conditions, des variations similaires sont observées : la fixation d'hormone par mg de protéines est de

$1,90.10^{-13}$ moles à 0°C, $1,94.10^{-13}$ à 25°C et $1,27.10^{-13}$ moles à 37°C. De plus, l'activité spécifique est peu différente de celle des hypophyses de rats normaux.

Lorsque des homogénats d'hypothalamus sont incubés à 37°C, 25°C et 0°C, on constate également une diminution de l'activité spécifique si la température du milieu d'incubation est augmentée (Tableau XXIII). La quantité d'androgène liée par mg de protéines hypothalamiques de rats normaux est de $0,52.10^{-13}$ moles à 37°C, $0,55.10^{-13}$ moles à 25°C et $1,35.10^{-13}$ moles à 0°C. Après incubation d'homogénats de rats castrés, des variations semblables sont observées : la teneur en radioactivité liée aux protéines est de $0,50.10^{-13}$ moles à 37°C, de $0,72.10^{-13}$ moles à 25°C et de $1,04.10^{-13}$ moles à 0°C. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes de celles observées pour les homogénats de rats normaux (Tableau XXIII).

- Incubation de coupes. Après incubation de coupes d'hypophyses de rats normaux, pendant 30 minutes, à 37°C, 25°C et 0°C, en présence de $3,5.10^{-8}$ Moles de testostérone-^{3}H, l'activité spécifique de l'association macromoléculaire androgénique décroît avec l'abaissement de la température (Tableau XXIII). Le taux d'androgène lié par mg de protéines hypophysaires est de $2,52.10^{-13}$ moles, $0,83.10^{-13}$ et $0,93.10^{-13}$ moles respectivement à 37°C, 25°C et 0°C. Des variations semblables sont obtenues lorsque des coupes d'hypophyses de rats castrés sont incubées : la fixation par mg de protéines hypophysaires est de $1,95.10^{-13}$ moles à 37°C, $2,0.10^{-13}$ moles à 25°C et $0,72.10^{-13}$ moles à 0°C. La castration des animaux n'entraîne pas de variations significatives de l'activité spécifique du complexe (Tableau XXIII).

Après incubation de coupes d'hypothalamus de rats normaux ou castrés, en présence de $3,5.10^{-8}$ Moles de testostérone-^{3}H, on observe un phénomène inverse (Tableau XXIII), comparable aux résultats obtenus pour les

TABLEAU XXIII

Influence de la température de l'incubation sur l'association macromoléculaire des androgènes dans l'hypophyse et l'hypothalamus du rat normal et castré depuis 40 jours.

Résultats exprimés en moles par mg de protéines.

1 - Incubation d'homogénats.

Température	Hypophyse		Hypothalamus	
	Normaux	Castrés	Normaux	Castrés
37°C	$1,16.10^{-13}$	$1,27.10^{-13}$	$0,52.10^{-13}$	$0,50.10^{-13}$
25°C	$1,94.10^{-13}$	$1,94.10^{-13}$	$0,55.10^{-13}$	$0,72.10^{-13}$
0°C	$2,32.10^{-13}$	$1,90.10^{-13}$	$1,35.10^{-13}$	$1,04.10^{-13}$

2 - Incubation de coupes.

Température	Hypophyse		Hypothalamus	
	Normaux	Castrés	Normaux	Castrés
37°C	$2,52 \pm 0,13.10^{-13}$	$1,95 \pm 0,04.10^{-13}$	$0,33 \pm 0,09.10^{-13}$	$0,30 \pm 0,08.10^{-13}$
25°C	$0,83.10^{-13}$	$2,0 \pm 0,2.10^{-13}$	$0,39 \pm 0,16.10^{-13}$	$0,38 \pm 0,07.10^{-13}$
0°C	$0,93.10^{-13}$	$0,72.10^{-13}$	$0,86.10^{-13}$	$0,86.10^{-13}$

3 - Incubation de cytosols.

Température	Hypophyse normaux
25°C	$0,77.10^{-13}$
0°C	$0,48.10^{-13}$

incubations d'homogénats. On constate, en effet, une augmentation de la quantité d'androgène lié aux protéines au cours de l'abaissement de la température du milieu d'incubation. La fixation d'androgène par mg de protéines hypothalamiques de rats normaux est de $0,33.10^{-13}$ moles à 37°C, $0,39.10^{-13}$ moles à 25°C et de $0,86.10^{-13}$ moles à 0°C. Il en est de même lorsque des coupes d'hypothalamus de rats castrés ont été incubées. La quantité d'hormone fixée par mg de protéines est de $0,30.10^{-13}$ moles à 37°C, de $0,38.10^{-13}$ moles à 25°C et de $0,86.10^{-13}$ moles à 0°C. Après orchidectomie des animaux, l'activité spécifique n'est pas différente de celle des organes de rats normaux (Tableau XXIII).

- Incubation de cytosols. Des incubations de cytosols d'hypophyses de rats normaux ont été effectuées, à 25°C et à 0°C, après addition de $1,4.10^{-9}$ M de testostérone-^{3}H. La quantité d'hormone fixée par mg de protéines décroît lorsque la température de l'incubation est abaissée. L'activité spécifique par mg de protéines est de $0,77.10^{-13}$ moles à 25°C et de $0,48.10^{-13}$ moles à 0°C (Tableau XXIII).

- Influence de la température du milieu d'incubation sur la captation et la répartition intra-cellulaire de la testostérone-^{3}H

Parallèlement à l'étude des variations de l'activité spécifique de l'association macromoléculaire de la testostérone-^{3}H en fonction de la température, il est intéressant d'examiner la captation et la répartition de la radioactivité entre les surnageants et les culots 800 g, obtenus après incubation de coupes ou d'homogénats d'hypophyses et d'hypothalamus.

- Incubation d'homogénats. L'étude de la répartition intracellulaire, après incubation d'homogénats d'hypophyses de rats normaux ou castrés à des températures variables, montre que la fraction surnageant 800 g, renferme, en moyenne, 90 % de la radioactivité. On n'observe pas de variations signi-

ficatives lorsque la température est abaissée de 37°C à 0°C (Tableau XXIV). Des résultats différents sont obtenus pour l'hypothalamus (Tableau XXIV). En effet, quelque soit la température de l'incubation, le culot 800 g renferme une quantité presque égale à celle du surnageant 800 g correspondant. La castration des animaux ne produit pas de modifications dans cette répartition (Tableau XXIV).

- Incubation de coupes de tissus. Les études effectuées en fonction de la variation de la température du milieu d'incubation montrent une captation totale de l'androgène, exprimée par mg de tissu , plus élevée à 37°C qu'à 25°C et à 0°C pour l'hypophyse et pour l'hypothalamus (Tableau XXIV). Pour la glande hypophysaire de rats normaux, 2,8 % sont fixés par mg de tissu à 37°C, 2,6 % à 25°C et 0,08 % à 0°C. Après castration, la captation totale, par mg de tissu, est supérieure : 4,1 % sont captés à 25°C et 0,23 % à 0°C (Tableau XXIV). Des résultats identiques sont obtenus pour l'hypothalamus. Lorsque des coupes d'hypothalamus de rats normaux sont incubées à 37°C, 1,5 % de la radioactivité sont fixés par mg de tissu, 1,3 % à 25°C et 0,04 % à 0°C (Tableau XXIV). Des variations similaires sont observées après incubation de coupes d'hypothalamus de rats castrés : 2 % sont captés à 37°C, 1,5 % à 25°C et 0,11 % à 0°C. Comme pour l'hypophyse antérieure, la captation totale de la testostérone-^{3}H par les hypothalamus de rats castrés est supérieure à celle des rats normaux (Tableau XXIV).

L'étude de la répartition de l'hormone entre le culot et le surnageant, séparés après centrifugation à 800 g, montre que la majeure partie de la radioactivité hypophysaire est présente dans le surnageant (Tableau XXIV). Il semble qu'un abaissement de la température du milieu d'incubation entraîne un accroissement du taux de la radioactivité présent dans le culot 800 g, peut-être par accumulation sur les membranes. Des expériences effectuées parallèlement avec des glandes hypophysaires de rats castrés conduisent à des résultats identiques (Tableau XXIV). Comme après incubation d'homogénats,

TABLEAU XXIV

Effet de la température de l'incubation sur la captation et la répartition de la radioactivité entre culot et surnageant 800 g, après incubation d'homogénats ou de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux ou castrés

1 - Incubation d'homogénats -

Répartition de la radioactivité dans les culots 800 g exprimée en % par rapport à la radioactivité totale de l'homogénat.

Température	Hypophyse		Hypothalamus	
	Normaux	Castrés	Normaux	Castrés
37°C	6,5	8	49	46
25°C	9		47	60
0°C	9	11	48	44

2 - Incubation de coupes -

a) Captation totale par mg de tissu, exprimée en % par rapport à la radioactivité du milieu d'incubation

Température	Hypophyse		Hypothalamus	
	Normaux	Castrés	Normaux	Castrés
37°C	2,8	1,8	1,5	2,04
25°C	2,6	4,1	1,3	1,5
0°C	0,08	0,23	0,04	0,11

b) Répartition de la radioactivité dans le culot 800 g exprimée en % par rapport à la radioactivité totale du tissu.

Température	Hypophyse		Hypothalamus	
	Normaux	Castrés	Normaux	Castrés
37°C	12,5	14	55	43
25°C	13	15	40	55
0°C	34	23	48	40

la répartition de la radioactivité intracellulaire hypothalamique de rats normaux ou castrés est différente de celle des hypophyses. En effet, 40 à 50 % de la radioactivité sont dosés dans la fraction sédimentée à 800 g (Tableau XXIV). On n'observe pas de résultats significativement différents lorsque les tissus incubés proviennent d'animaux castrés (Tableau XXIV).

β) Effets de la durée de l'incubation

Des coupes d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux ont été incubées à 37°C, en présence de $3,5.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, pendant 30, 60, 90, 120 minutes. L'activité spécifique de l'association protéines-androgène est déterminée après chromatographie sur Sephadex G 25. La captation totale de la testostérone-^{3}H et sa répartition intracellulaire sont également examinées.

- Influence sur le taux d'hormone lié

La teneur en androgène lié par l'hypophyse varie avec l'allongement de l'incubation. Elle est de $2,46.10^{-13}$ moles par mg de protéines après 60 minutes (Tableau XXV), de $3,29.10^{-13}$ moles après 90 minutes. Elle augmente ensuite beaucoup moins fortement. Après 120 minutes d'incubation, l'activité spécifique est de $3,50.10^{-13}$ moles (figure 17, Tableau XXV). Les résultats obtenus pour l'hypothalamus sont différents puisque le taux d'hormone lié par mg de protéines est de $0,46.10^{-13}$ moles après une période d'incubation de 60 minutes et reste identique après 90 minutes d'incubation (Figure 17, Tableau XXV).

- Influence sur la captation et sur la répartition intracellulaire de la radioactivité

La captation de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure augmente pendant toute la durée de l'incubation. Cet accroissement est

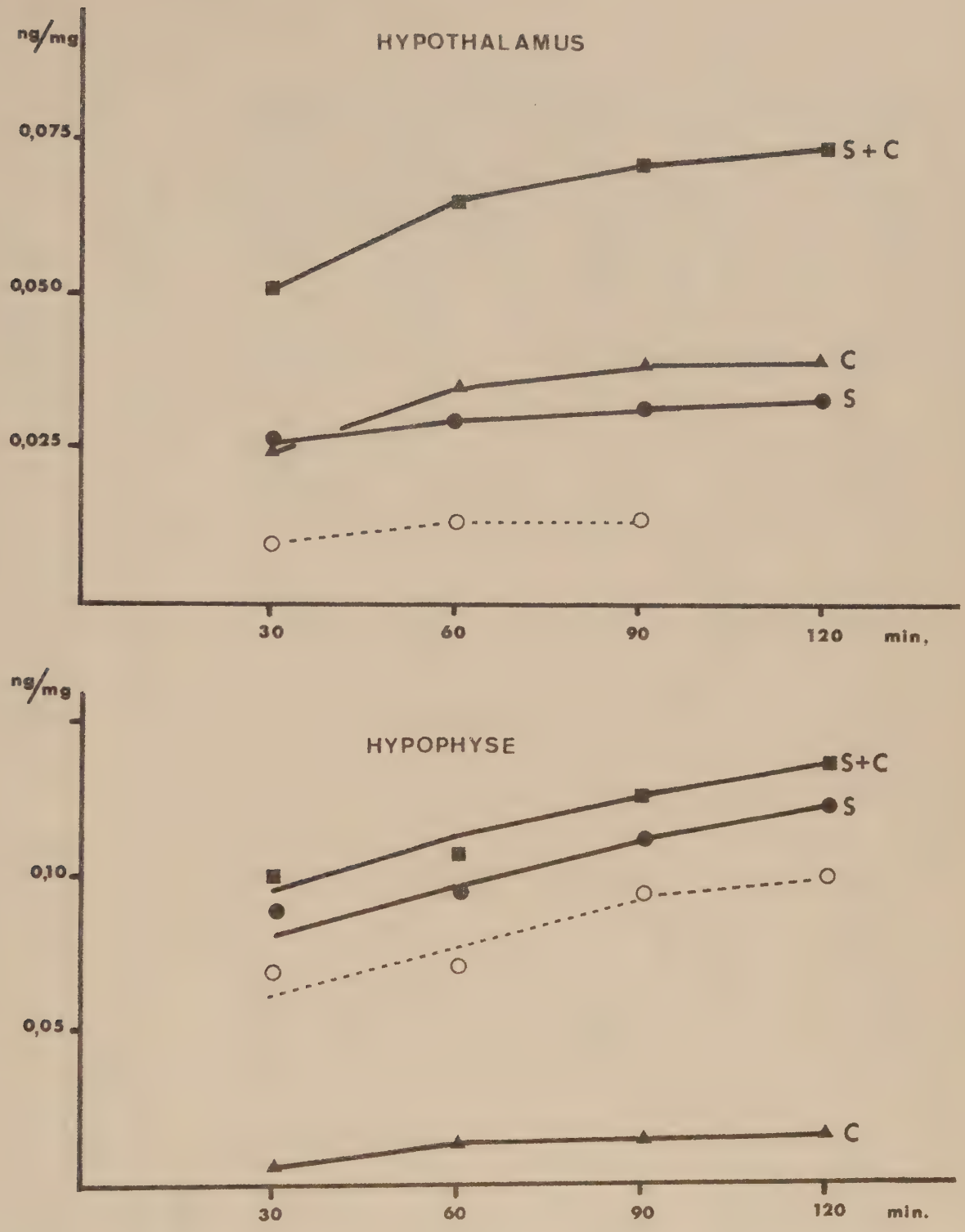


Fig. 17 - Variations du taux de la testostérone-^{3}H incorporée par le surnageant (S) et le culot 800 g (C) et de l'association macromoléculaire (---) de cette hormone en fonction de la durée des incubations de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux, en présence de $3,5.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H et à 37°C.

- Abscisses : temps en minutes
- Ordonnées : fixation en ng par mg de tissu (—) ou de protéines(--)

TABLEAU XXV

Variation du taux de la testostérone-^{3}H captée par le surnageant et le culot 800 g, du taux d'hormone liée aux protéines, en fonction de la durée des incubations de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux adultes, en présence de $3,5.10^{-8}$ M d'hormone.

Résultats exprimés en ng et en moles de testostérone-^{3}H par mg de tissu ou de protéines

HYPOPHYSE ANTERIEURE

	30 minutes	60 minutes	90 minutes	120 minutes
Captation totale par mg de tissu	0,100 ng $3,5.10^{-13}$ moles	0,107 ng $3,7.10^{-13}$ moles	0,128 ng $4,45.10^{-13}$ moles	0,139 ng $4,85.10^{-13}$ moles
Captation par le S.800g (en mg de tissu)	0,091 ng $3,1.10^{-13}$ moles	0,094 ng $3,2.10^{-13}$ moles	0,113 ng $3,9.10^{-13}$ moles	0,123 ng $4,2.10^{-13}$ moles
Captation par le culot 800 g (en mg de tissu)	0,0096 ng $0,33.10^{-13}$ moles	0,0137 ng $0,47.10^{-13}$ moles	0,0145 ng $0,50.10^{-13}$ moles	0,0175 ng $0,60.10^{-13}$ moles
Pourcentage de radio-activité présente dans le culot 800 g	9 %	12 %	11 %	12 %
Radioactivité liée par mg de protéines	0,070 ng $2,43.10^{-13}$ moles	0,071 ng $2,46.10^{-13}$ moles	0,095 ng $3,29.10^{-13}$ moles	0,101 ng $3,50.10^{-13}$ moles

TABLEAU XXV

Variations du taux de la testostérone-^{3}H captée par le surnageant et le culot 800 g, du taux d'hormone liée aux protéines, en fonction de la durée des incubations de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux adultes, en présence de $3,5.10^{-8}$ M d'hormone.

Résultats exprimés en ng et en moles de testostérone-^{3}H par mg de tissu ou de protéines.

HYPOTHALAMUS

	30 minutes	60 minutes	90 minutes	120 minutes
Captation totale par mg de tissu	0,051 pg $1,77.10^{-13}$ moles	0,065 ng $2,26.10^{-13}$ moles	0,0715nng $2,48.10^{-13}$ moles	0,0741 pg $2,57.10^{-13}$ moles
Captation par le surnageant 800 g (en mg de tissu)	0,026 ng $0,91.10^{-13}$ moles	0,030 ng $1,04.10^{-13}$ moles	0,032 ng $1,11.10^{-13}$ moles	0,034 ng $1,18.10^{-13}$ moles
Captation par le culot 800 g (en mg de tissu)	0,025 ng $0,87.10^{-13}$ moles	0,035 ng $1,22.10^{-13}$ moles	0,0395 ng $1,37.10^{-13}$ moles	0,040 ng $1,38.10^{-13}$ moles
Pourcentage de radio-activité présente dans le culot 800 g	48 %	54 %	55 %	53 %
Radioactivité liée par mg de protéines	0,0092 ng $0,32.10^{-13}$ moles	0,013 ng $0,46.10^{-13}$ moles	0,013 ng $0,46.10^{-13}$ moles	

cependant assez faible puisqu'il n'est que de 28 % entre 30 et 120 minutes d'incubation (Figure 17). La radioactivité présente dans le surnageant 800 g varie parallèlement (Figure 17). Elle augmente de 30 % entre 60 et 120 minutes. L'accroissement de la radioactivité dans le culot 800 g est parallèle. Il est de 27 % pour la même période d'incubation (Figure 17, Tableau XXV). Le taux de radioactivité du culot 800 g, exprimé par rapport à la captation totale, reste constant après 60 minutes d'incubation, et est, en moyenne, de 12 % (Tableau XXV).

La captation de la radioactivité par l'hypothalamus tend à devenir constante après 60 minutes d'incubation. L'augmentation du taux d'hormone, capté par mg de tissu, ne croît que de 14 % entre la première et la deuxième heure d'incubation. Le même pourcentage d'augmentation est obtenu pour le surnageant et le culot 800 g qui varient parallèlement (Tableau XXV). Après 60 minutes d'incubation, la radioactivité dans le culot 800 g représente 54 % de la radioactivité du tissu. Ce pourcentage reste constant jusqu'à la fin de l'incubation. La répartition intra-cellulaire de l'hormone ne varie donc pas (Figure 17, Tableau XXV).

b) In vivo

α) Influence de la gonadectomie sur l'association macromoléculaire des androgènes de l'hypophyse

L'influence de la castration sur la captation de la testostérone-^{3}H et sa liaison aux protéines du cytosol a été étudiée après injection à des rats adultes normaux ou orchidectomisés depuis 10 jours.

La captation totale de la testostérone-^{3}H, exprimée pour 100 mg de tissu, est augmentée de 124 % lorsque les rats sont castrés. Le surnageant 800 g présente une augmentation aussi importante (Tableau XXVI,

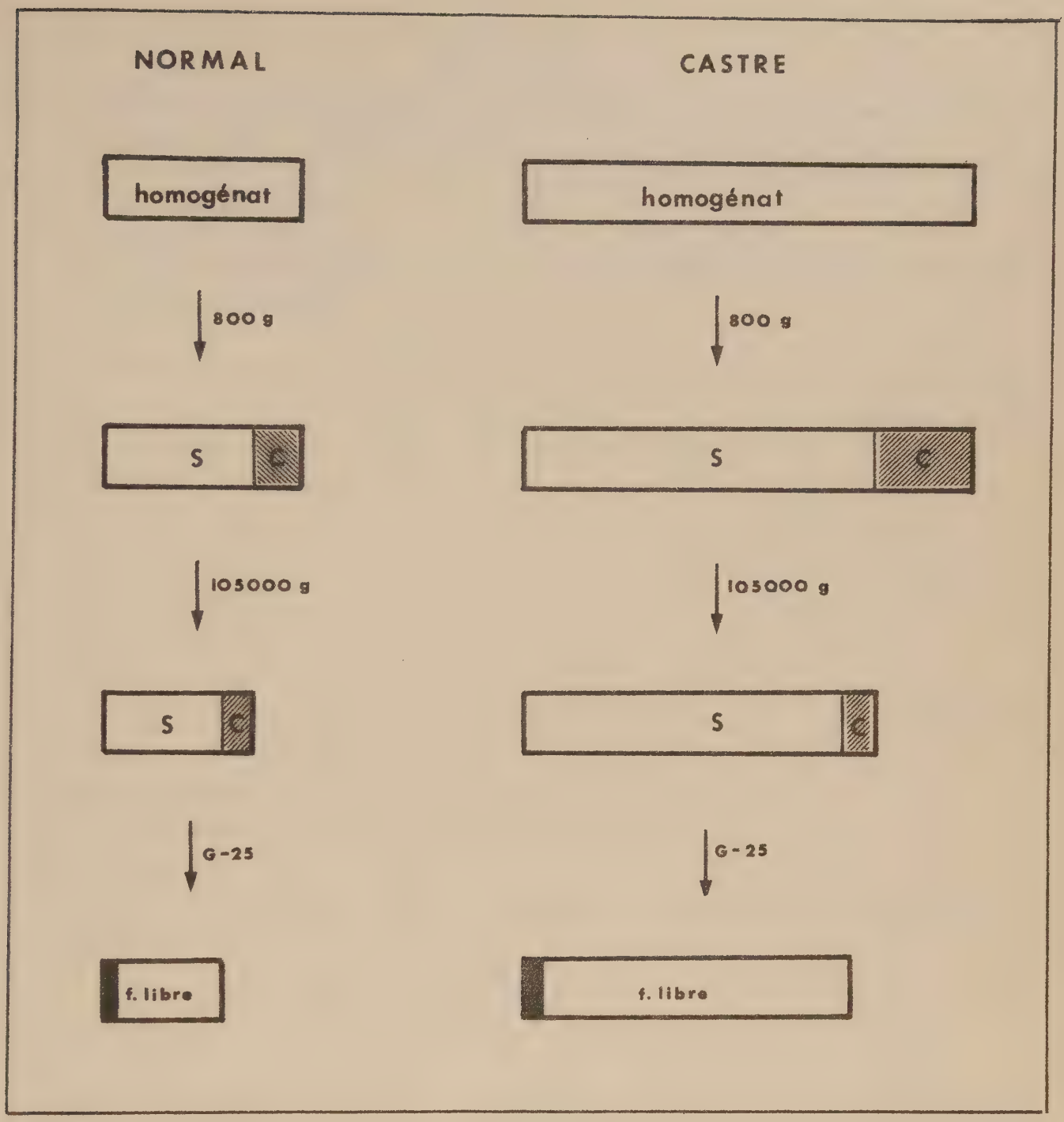


Fig. 18 - Répartition intra-cellulaire des androgènes dans l'hypophyse du rat normal et castré après injection I.P. de testostérone-^{3}H.

⟝⟞ : 10 pg d'hormone pour 100 mg de tissu (Tableau XXVI)

Rectangle blanc : S = Surnageants

Rectangle hachuré : C = Culot

Rectangle noir : Fraction liée aux protéines.

TABLEAU XXVI

Influence de l'orchidectomie des animaux sur la captation de la testostérone ^{3}H par l'hypophyse 5 minutes après l'injection de 0,2 µg de cette hormone par voie intrapéritonéale.

Résultats exprimés en pg et en moles de testostérone-^{3}H pour 100 mg de tissu ou par mg de protéines

	Rats normaux	Rats castrés (10 jours)
Captation totale pour 100 mg de tissu	34 pg $1,2.10^{-13}$ moles	76 pg $2,6.10^{-13}$ moles
Captation par le surnageant 800 g (pour 100 mg de tissu)	24,5 pg $0,84.10^{-13}$ moles	60 pg $2,08.10^{-13}$ moles
Radioactivité du culot 800 g, exprimée en % de la radioactivité totale du tissu	28 %	22 %
Captation par le cytosol pour 100 mg de tissu	19,2 pg $0,66.10^{-13}$ moles	55,9 pg $1,94.10^{-13}$ moles
par mg de protéines	4,50 pg $0,15.10^{-13}$ moles	10,80 pg $0,37.10^{-13}$ moles
Radioactivité du culot 105 000 g	22 %	7 %
Radioactivité liée par mg de protéines	0,56 pg $0,0195.10^{-13}$ moles	0,73 pg $0,025.10^{-13}$ moles
Pourcentage de radioactivité liée dans le cytosol	14 %	7 %

figure 18). Par contre, le pourcentage de la radioactivité du culot 800 g n'est pas modifié. Il y a donc accroissement de la radioactivité totale de l'organe mais pas de changement significatif dans la répartition entre surnageant 800 g et culot 800 g. Il faut cependant noter que le taux de radioactivité, présent dans ce culot 800 g, est supérieur à celui obtenu après incubation de coupes d'hypophyses à 37°C, probablement en raison du marquage plus important des érythrocytes . Après fractionnement du surnageant 800 g par centrifugation à 105.000 g, le cytosol contient la majeure partie des androgènes (Tableau XXVI, Figure 18) : 78 % de la radioactivité du surnageant 800 g d'hypophyses de rats normaux et 93 % dans le cas des rats castrés. La différence, due à la castration, observée dans le surnageant 800 g persiste dans le cytosol (Tableau XXVI). La radioactivité du cytosol de rats normaux est de 4,50 pg par mg de protéines, celle du cytosol d'animaux castrés est de 10,80 pg par mg de protéines ce qui signifie une augmentation de 145 %. Si l'on examine ensuite l'activité sécifique de la liaison, on constate qu'elle varie également après castration des animaux. L'accroissement de la radioactivité liée aux protéines du cytosol d'hypophyses de rats castrés est de 30 % par rapport à celle des rats normaux (Tableau XXVI). L'augmentation très importante de la radioactivité du cytosol total provient donc principalement d'un accroissement de la quantité d'hormone libre. En effet, si on calcule le pourcentage de la radioactivité liée aux protéines en fonction de la radioactivité totale du cytosol, 14 % sont liés aux protéines du cytosol hypophysaire de rats normaux et 7 % seulement après castration (Tableau XXVI).

β) Evolution de l'association macromoléculaire des androgènes en fonction du temps

Après injection intra-péritonéale de testostérone-^{3}H à des rats normaux adultes, la radioactivité atteint son maximum dans l'hypophyse très rapidement, puis décroît ensuite très brusquement. Entre 30 et

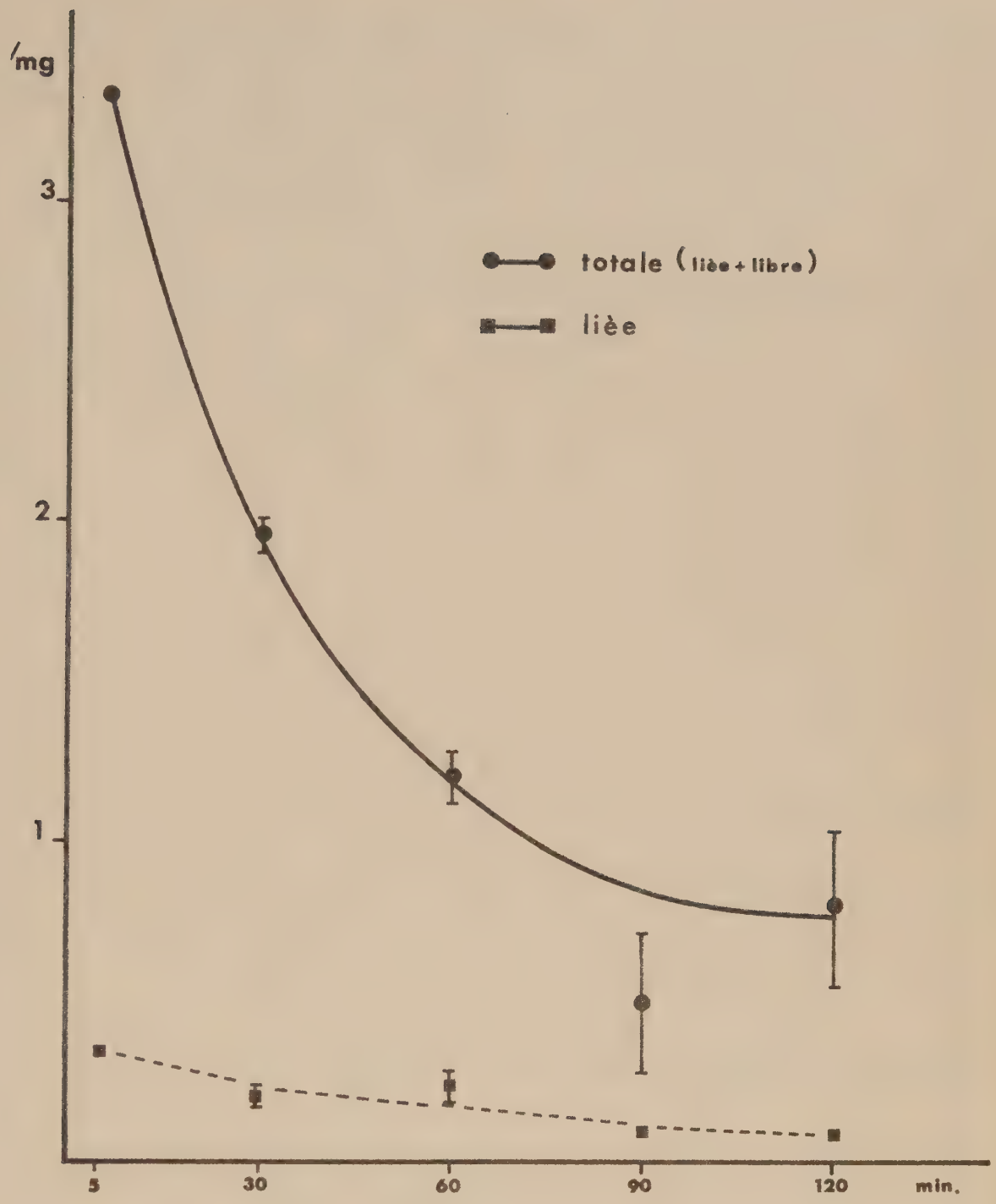


Fig. 19 - Radioactivité de la fraction post-mitochondrial (S. 39.000 g) après injection intra-péritonéale de testostérone-^{3}H à des rats normaux.

- Abscisses : temps après l'injection en minutes
- Ordonnées : Hormone fixée en pg par mg de protéines.

TABLEAU XXVII

Variations du taux d'hormone captée et liée par l'hypophyse de rats normaux adultes après injection intra-péritonéale de 0,2 µg de testostérone-^{3}H à des temps variables.

Résultats exprimés en pg et en moles de testostérone-^{3}H par mg de tissu ou de protéines (moyenne de 2 à 4 expériences).

	5 minutes	30 minutes	60 minutes	90 minutes	120 minutes
Captation totale par mg de tissu	0,34 pg $0,12.10^{-14}$ moles	0,069 pg $0,024.10^{-14}$ moles	0,064 pg $0,022.10^{-14}$ moles	0,054 pg $0,019.10^{-14}$ moles	0,046 pg $0,016.10^{-14}$ moles
Radioactivité du surnageant 39.000 g par mg de protéines	3,32 pg $1,15.10^{-14}$ moles	1,98 ± 0,02 pg $0,69.10^{-14}$ moles	1,20 ± 0,08 pg $0,41.10^{-14}$ moles	0,49 ± 0,22 pg $0,17.10^{-14}$ moles	0,79 ± 0,25 pg $0,27.10^{-14}$ moles
Radioactivité liée du surnageant 39.000 g par mg de protéines	0,34 pg $0,12.10^{-14}$ moles	0,20 ± 0,02 pg $0,070.10^{-14}$ moles	0,23 ± 0,05 pg $0,081.10^{-14}$ moles	0,076 ± 0,002 pg $0,026.10^{-14}$ moles	0,084 ± 0,01 pg $0,029.10^{-14}$ moles
Pourcentage de radioactivité liée dans le surnageant 39.000 g	10,2 %	10,2 %	19,5 %	15,5 %	10,6 %

120 minutes après l'injection, la radioactivité totale captée par l'hypophyse reste assez stable. La radioactivité du surnageant post-mitochondrial(39.000 g) varie parrallèlement.

Très élevée 5 minutes après l'administration de la testostérone-^{3}H, elle décroît rapidement pendant la première heure, puis reste constante. Le surnageant 39.000 g contient 1,20 pg d'hormone par mg de protéines 60 minutes après l'injection et 0,79 pg 120 minutes plus tard.

La décroissance de la radioactivité du surnageant 39.000 g, observée pendant la première heure après l'injection de l'hormone, se traduit par une diminution régulière de la quantité d'hormone liée aux protéines (Figure 19, Tableau XXVII). L'activité spécifique de l'association macromoléculaire des androgènes est de $0,12.10^{-14}$ moles par mg de protéines 5 minutes après l'injection, $0,070.10^{-14}$ 30 minutes plus tard (Figure 19, Tableau XXVII). Elle n'est plus que de $0,029.10^{-14}$ moles 2 heures après l'injection initiale. Entre 5 et 120 minutes après l'administration de la testostérone-^{3}H, la radioactivité totale du cytosol diminue de 23,8 % et la radioactivité associée aux protéines après chromatographie sur Sephadex G 25 est abaissée de 23,5 %

3 - Etude de l'association macromoléculaire des androgènes dans l'hypophyse antérieure

a) Nature de la macromolécule soluble liant les androgènes du cytosol hypophysaire

Afin de déterminer la nature des macromolécules liant les androgènes, nous avons étudié l'effet d'un enzyme protéolytique, la trypsine. L'action de cet enzyme sur le complexe macromoléculaire formé dans le cytosol après incubation de coupes d'hypophyses de rats normaux en présence de 2.10^{-8} M de testostérone-^{3}H, entraîne une diminution de la radioactivité présente dans le volume d'exclusion de 27 % par rapport au cytosol témoin.

Le profil d'élution des protéines est modifié de façon importante, ce qui indique une action positive de cet enzyme.

b) Etude de l'association macromoléculaire des androgènes sur Sephadex G 100 et G 200

α) Etalonnage des gels de Sephadex G 100 et G 200

Les résultats de l'étalonnage des colonnes de gel de Sephadex G 100 et G 200 avec des protéines de poids moléculaire connu sont donnés dans le tableau XXVIII en termes de K_{av}. Le comportement de l'hemoglobine sur Sephadex G 200 est celui d'une molécule dissociée en sous-unités (Tableau XXVIII). ANDREWS a montré que la dissociation est fonction de la concentration de cette protéine (150).

TABLEAU XXVIII

Etalonnage des colonnes de gels de Sephadex G 100 et G 200 avec des protéines de P.M. connu et la testostérone-^{3}H. Les résultats sont exprimés en K_{av} (145) ($K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$)

Substances de référence	Poids moléculaire	Sephadex G 100		Sephadex G 200
Bleu Dextran	2.000.000	0		0
Serum albumine de boeuf dimère	134.000	0,10	(0,11)	
Serum albumine de boeuf monomère	67.000	0,20	(0,22)	0,34
Ovalbumine	45.000		(0,33)	0,44
Hemoglobine	64.000			0,48
Chymotrypsinogène	25.000		(0,48)	
Trypsine	23.800			0,60
Myoglobine	17.500			0,65
Testostérone-^{3}H	288	1,1		0,92

Les valeurs entre parenthèses sont empruntées à ANDREWS (150).

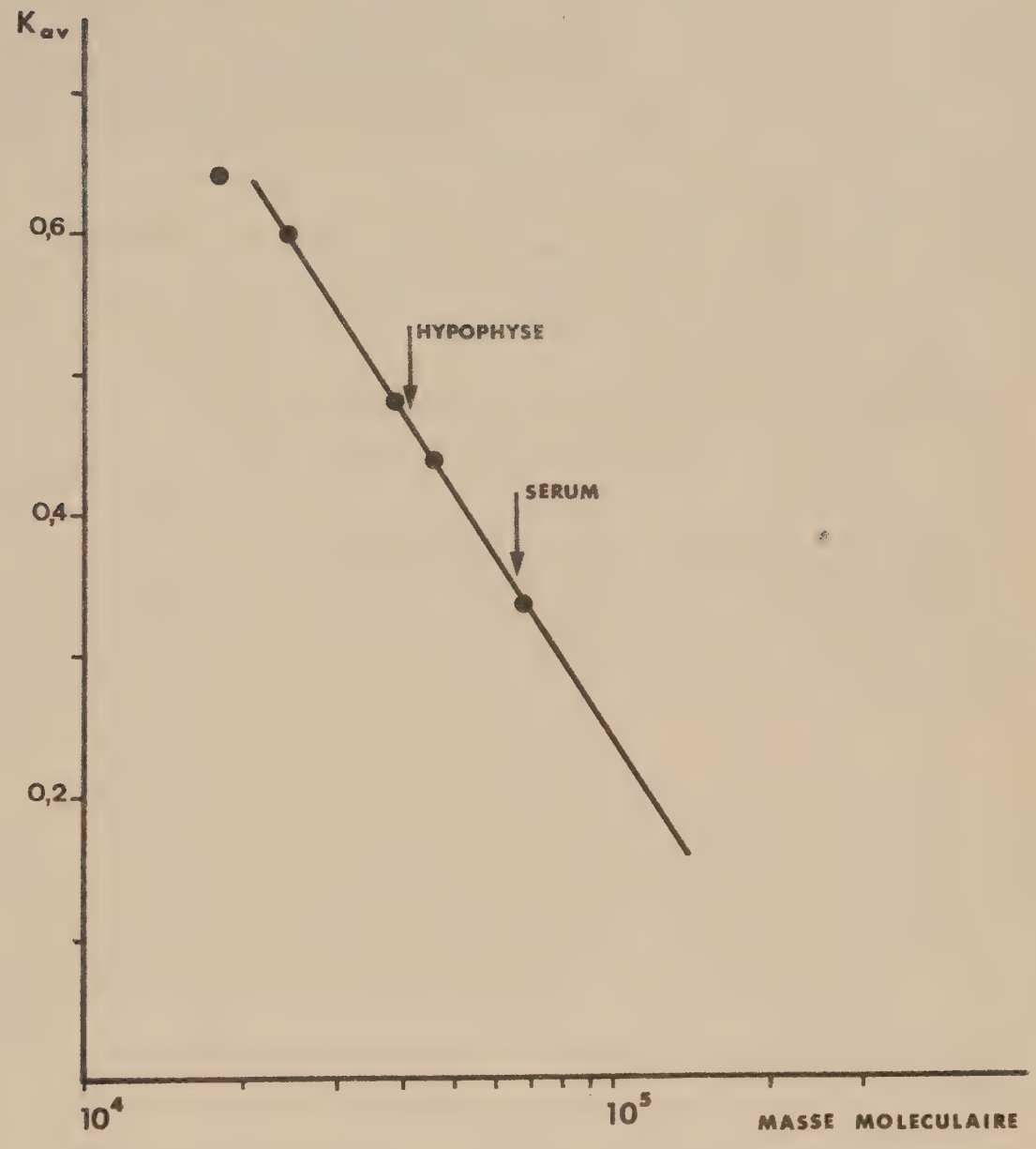


Fig. 20 - Variations de K_{av} en fonction du poids moléculaire des protéines standarts sur Sephadex G 200 (Tableau XVIII)

- En abscisses : Poids moléculaire en échelle logarithmique
- En ordonnées : Valeurs de K_{av}

(Les flèches indiquent la radioactivité des extraits hypophysaires et du sérum).

La figure 20 montre l'évolution de K_{av} en fonction du poids moléculaire des protéines (échelle logarithmique) pour le gel de Sephadex G 200. Le domaine de fractionnement n'est utilisable que dans la zone principale (seule représentée) où la relation entre le K_{av} et le log du P.M. est linéaire, alors qu'aux extrémités des échelles de P.M., ce sont des lignes incurvées que l'on observe. D'après ACKERS, le Sephadex G 200 convient pour les protéines globulaires de P.M. compris entre 10.000 et 300.000 (151).

ß) Comportement du complexe hypophysaire des androgènes sur le gel de Sephadex G 100

Les complexes macromoléculaires de cytosols incubés en présence de testostérone-^{3}H ou préparés après incubation de coupes d'hypophyses en présence de l'androgène radioactif ont été isolés sur Sephadex G 25, puis fractionnés sur Sephadex G 100.

Quelque soit l'incubation effectuée initialement, les protéines du cytosol hypophysaire sont éluées en 2 fractions principales : la première est exclue du gel, la seconde a un K_{av} de 0,44 (Figure 21). Le coefficient de récupération des protéines est, en moyenne, de 70 %. Par contre, la radioactivité n'est pas associée aux mêmes protéines selon les conditions d'incubation initiales (Figure 21). Lorsque des coupes de tissu sont incubées à 25°C, pendant 30 minutes, après addition de $1,0.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, la radioactivité liée du cytosol est éluée entre les 2 fractions principales des protéines (Figure 21 C). Elle présente un K_{av} de 0,24, donc inférieur à celui de la sérum-albumine monomère (Tab. XXVIII). Par contre, la fraction liée radioactive du cytosol, incubé à 25°C, avec de la testostérone-^{3}H (2.10^{-9} M) est éluée, avec le premier pic de protéines, dans le volume exclu de la colonne (Figure 21 A). L'influence de la température d'incubation du cytosol est importante. Après incubation du cytosol, en présence de testostérone-^{3}H dans des conditions identiques aux précédentes mais à une température

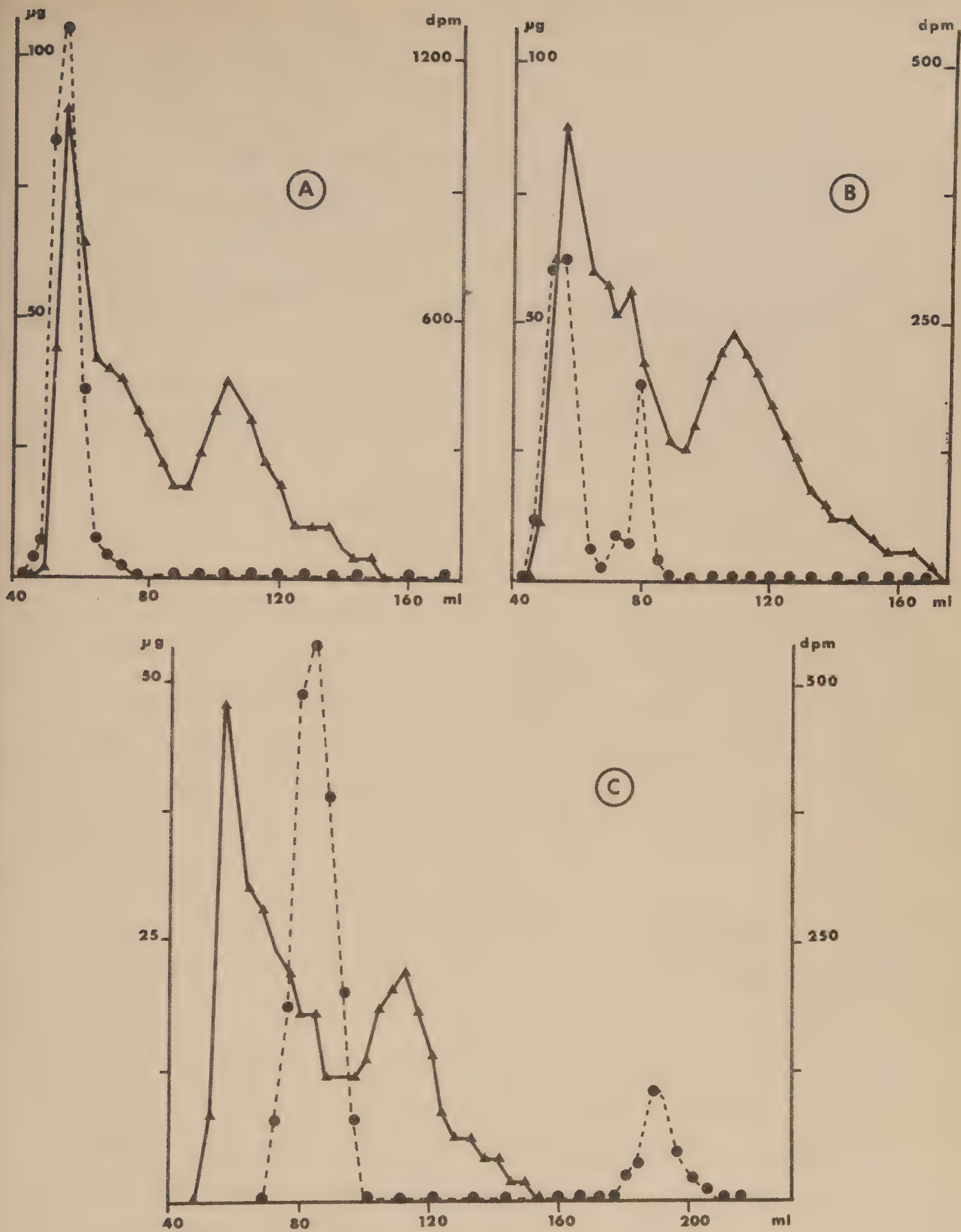


Fig. 21 - Chromatographies sur gel de Sephadex G 100 de cytosol hypophysaire, incubé à 25°C (A) ou à 0°C (B), ou préparé après incubation de coupes à 25°C (C).

- Ordonnées : - à gauche, taux des protéines en µg par ml d'éluat
  - à droite, dpm par ml d'éluat
- Abscisses : Fractions éluées en ml

En trait plein : Elution des protéines

En pointillé : Elution de la radioactivité.

de 0°C, la radioactivité liée aux protéines est éluée en 2 fractions : la première est exclue du gel, la seconde à un K_{av} de 0,24 (Figure 21 B).

Dans tous les cas, le complexe macromoléculaire, isolé par filtration sur Sephadex G 25 fine, reste assez stable puisque seulement 15 % de l'hormone sont obtenus sous forme libre après fractionnement sur G 100. La radioactivité libre est représentée seulement sur la figure 21 C. Le pourcentage de récupération de la radioactivité est, en moyenne, de 90 %.

γ) Comportement du complexe hypophysaire des androgènes sur gel de Sephadex G 200

Le complexe macromoléculaire, formé après addition de testostérone-^3H au cytosol d'hypophyses, étant exclu sur gel de Sephadex G 100, des essais de fractionnement sont effectués sur Sephadex G 200. Des cytosols hypophysaires, provenant d'incubation de coupes ou préparés après injection de l'hormone,sont également chromatographiés sur Sephadex G 200 (Figure 22).

- *In vitro* :

Des fractions (2 ml) de cytosol hypophysaire,incubé en présence de testostérone-^3H ($3,0.10^{-8}$ M), à 25°C, pendant 30 minutes, sont déposées sur des colonnes de gel de Sephadex G 200. D'après le diagramme d'élution (Figure 22 A), les protéines sont éluées en 3 pics principaux de K_{av} 0,02, 0,33 et 0,51. Le second pic (K_{av} = 0,33) présente un épaulement dont le sommet à un K_{av} égal à 0,40. La radioactivité est séparée en 2 fractions : l'une éluée avec les protéines exclues du gel, (K_{av} = 0,02), la seconde correspondant au passage de l'hormone libre (Figure 22 A). Seul le début de l'élution de la radioactivité libre est représenté sur la figure 22 A.

Des fractions de cytosol provenant d'incubations de coupes d'hypophyses, effectuées à 37°C, pendant 30 minutes après addition de testostérone-^3H

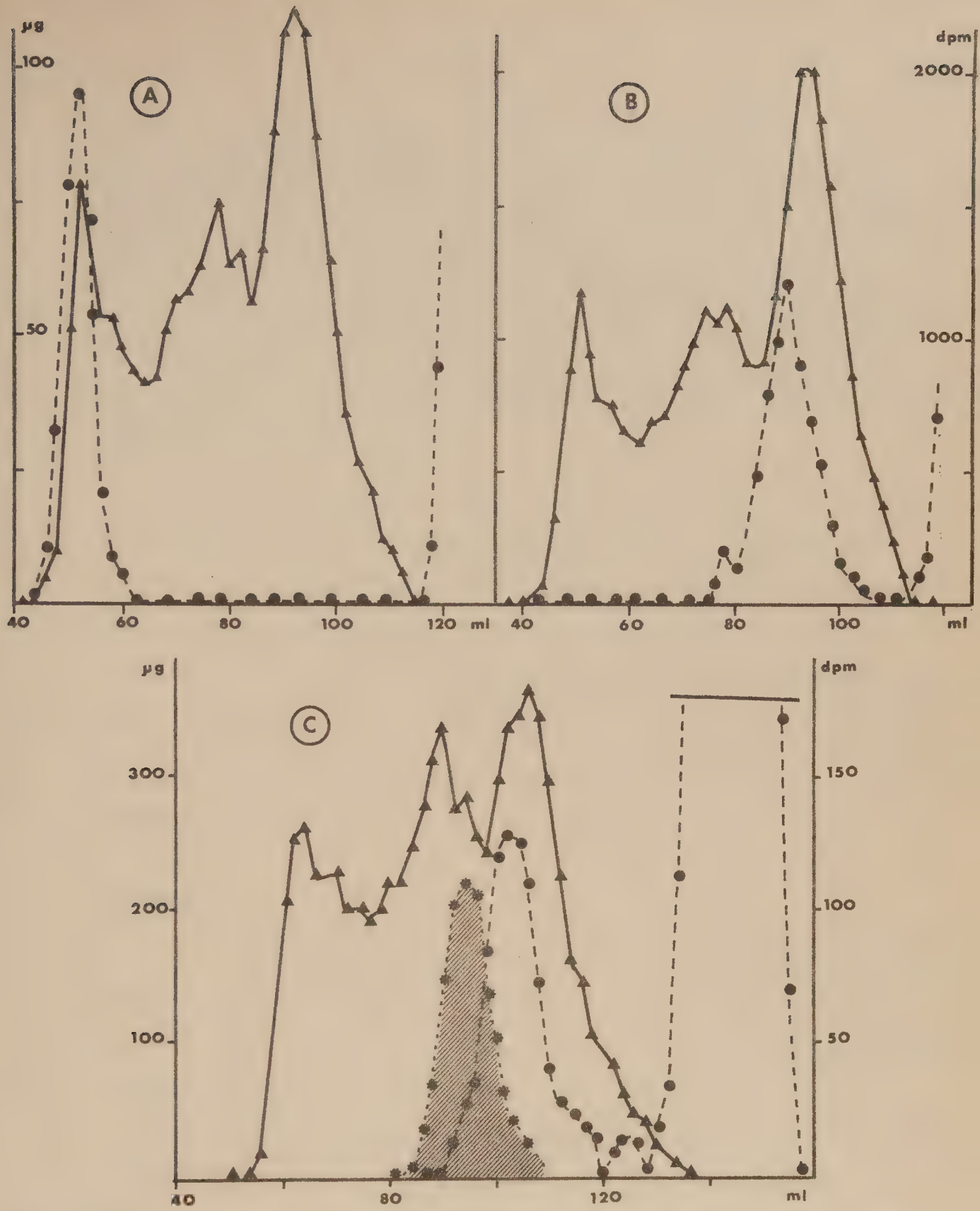


Fig. 22 - Chromatographies sur gel de Sephadex G 200 de cytosol hypophysaire, incubé à 25°C (A) ou préparé après incubation de coupes (B) ou après injection I.P(C)

- Ordonnées : - A gauche, taux de protéines en µg par ml d'éluat
  - A droite, dpm par ml d'éluat
- Abscisses : Fractions éluées en ml

En trait plein : Elution des protéines hypophysaires

En pointillé : Elution de la radioactivité hypophysaire

Zone hachurée : Zone d'élution de la radioactivité liée du sérum.

(10^{-8} M) sont chromatographiées sur Sephadex G. 200. Les protéines sont éluées en 4 fractions comme précédemment, de K_{av} successifs : 0,04, 0,30, 0,34, 051. Quant à la radioactivité, elle est séparée en 2 fractions, l'une de K_{av} 0,47, l'autre de K_{av} égal à 0,91 correspondant à l'hormone libre (Figure 22 B). Le poids moléculaire apparent de la fraction radioactive éluée avec les protéines de P.M. proche de l'ovalbumine, calculé d'après le graphique 20, serait de.40.000.

Des dépôts identiques de fractions cytosoliques, incubées avec de la testostérone-^{3}H (10^{-8} M) sont chromatographiés sur Sephadex G 25 et G 200. L'activité spécifique après filtration sur Sephadex G 25 est de 6 800 dpm par mg de protéines. Celle du pic d'élution de l'hormone sur Sephadex G 200, calculée pour chaque fraction éluée, est relativement constante à 28.100 dpm par mg de protéines. La gel filtration sur G 200 produit donc une purification de 4 fois. Le coefficient de récupération de la radioactivité est de 97 %.

- *In vivo* :

Le cytosol d'hypophyses de rats, ayant reçu une injection intrapéritonéale de testostérone-^{3}H (0,2 µg par rat) et sacrifiés 5 minutes plus tard, est fractionné sur gel de Sephadex G 200 (Figure 22 C). Le diagramme d'élution des protéines est comparable aux précédents (Figure 22 C). Les K_{av} des 4 fractions protéiques sont respectivement égaux à 0,06, 0,30, 0,34 et 0,51. La radioactivité est éluée en 2 pics : le premier, associé avec des protéines, a un K_{av} de 0,47 ; le second est élué avec l'hormone libre (K_{av} = 0,91).

Afin d'éliminer l'hypothèse d'une association de l'hormone avec les constituants du sérum, le sang des rats ayant reçu une injection I.P. de testostérone-^{3}H est recueilli. Une fraction aliquote de sérum (1 ml) est

chromatographiéesur le Sephadex G 200. La radioactivité est éluée en deux parties : l'une associée à un pic de protéines, l'autre, beaucoup plus importante, sous forme d'hormone libre. La première fraction radioactive (représentée sur la figure 22 C) a un K_{av} de 0,36 et est associée à un pic de protéines sériques de K_{av} 0,34 ne figurant pas sur le diagramme 22 C. Elle correspond donc au passage de la sérum-albumine et est nettement différente de la fraction radioactive du cytosol hypophysaire (Figure 22 C).

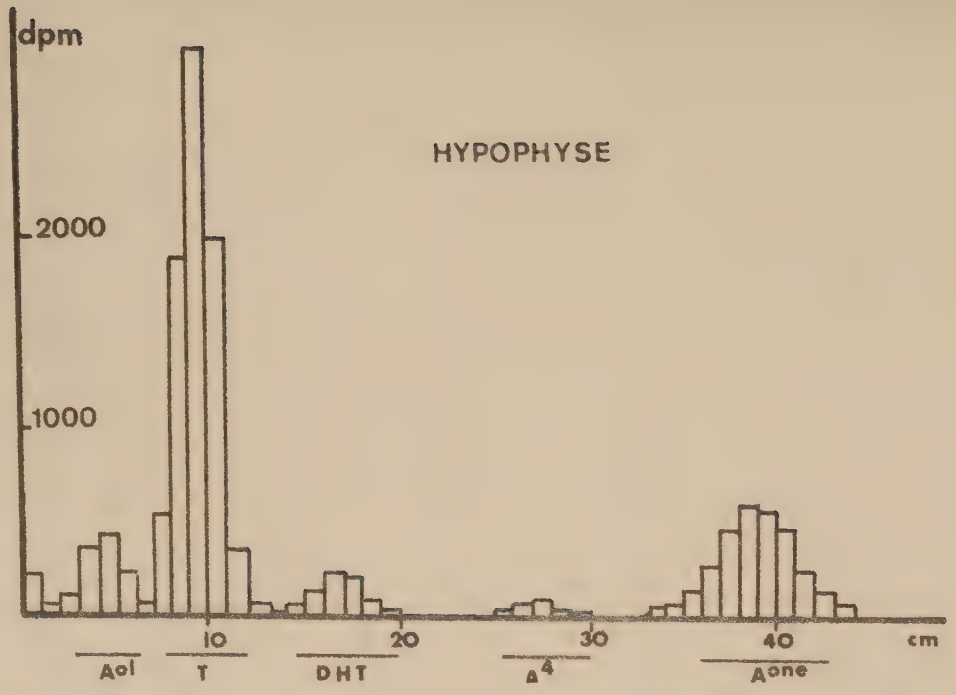
c) *Etude de la nature des androgènes de l'hypophyse et comparaison avec l'hypothalamus, la prostate, le cortex cérébral et le muscle*

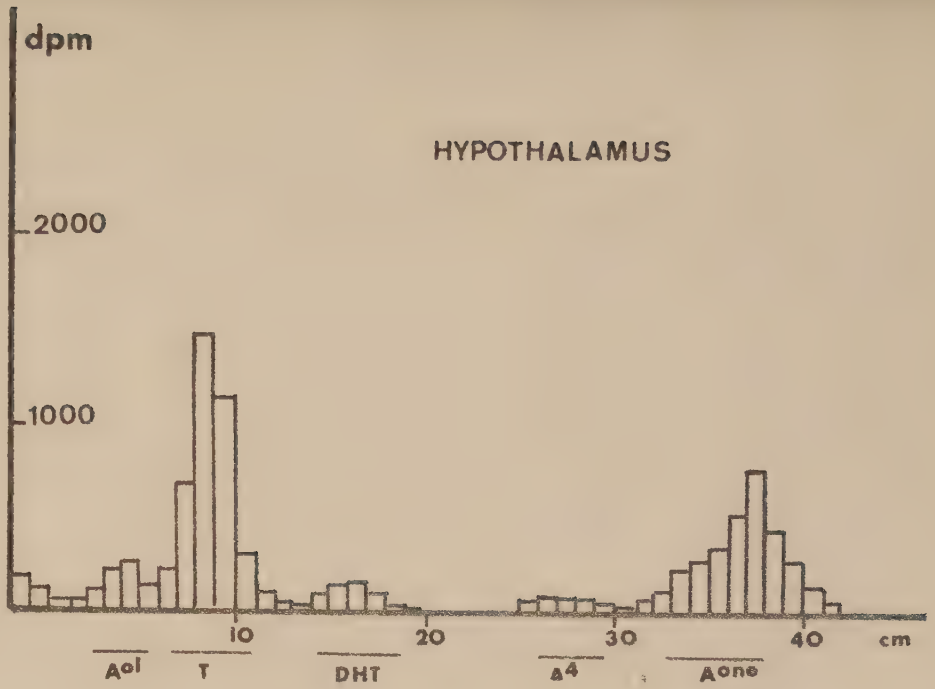
Nous avons préalablement montré la formation d'un complexe macromoléculaire soluble des androgènes dans le cytosol de l'hypophyse et de l'hypothalamus du rat. Ce complexe est obtenu, *in vitro*, après incubation de coupes, d'homogénats et de cytosols en présence de testostérone-^{3}H, et *in vivo*, après injection de cette hormone. A ce stade, il s'avère nécessaire de savoir si la testostérone est seule ou non associée aux macromolécules cytoplasmiques solubles. Nous avons d'abord étudié, *in vitro*, le métabolisme de la testostérone-^{3}H, en fonction du temps dans l'hypophyse du rat normal. Une étude comparative a été réalisée avec l'hypothalamus et la prostate. Quelques incubations de cortex cérébral et de muscle ont également été effectuées :

α) Métabolisme de la testostérone-^{3}H, *in vitro*.

- Analyse des stéroïdes liés dans le surnageant 800 g après incubation de coupes de tissu

Des coupes d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de prostate ventrale de rats normaux sont incubées à 37°C, pendant 30, 60, 120 et 180 minutes en présence de $3{,}8.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H. Après filtration





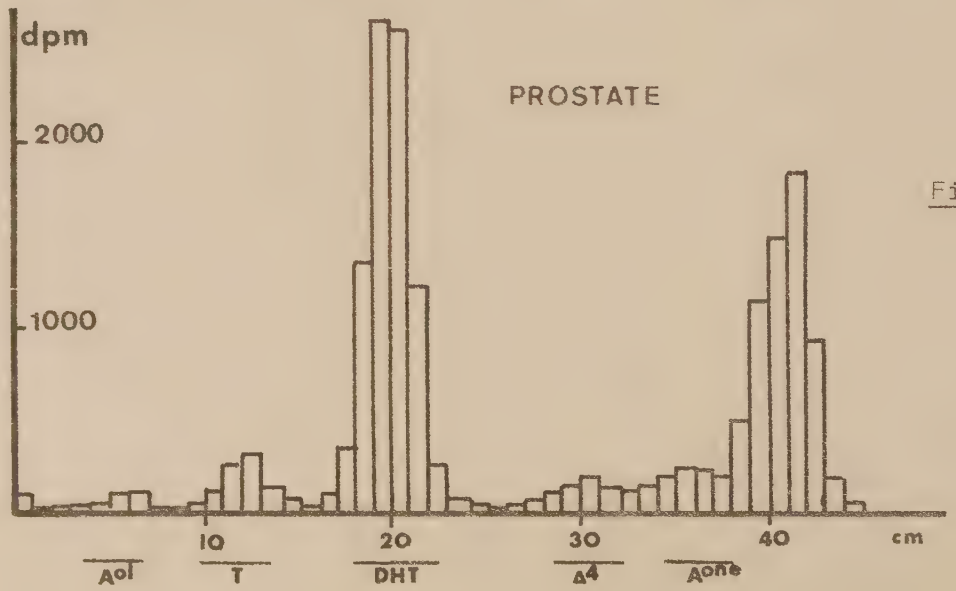


Fig. 23 - Chromatographie dans le système de Kochakian de la fraction exclue sur G 25 après incubation de coupes de tissu de rats normaux, pendant 2 heures à 37°C, en présence de testostérone-^{3}H.
En ordonnées : radioactivité en dpm par cm
En abscisses : migration des stéroïdes en cm
La position des stéroïdes témoins sur le chromatogramme est indiquée en traits pleins. A^{ol} : androstanediols, T = testostérone, DHT = dihydrotestostérone, Δ_4 = androstènedione, A^{one} = androstanedione.

sur Sephadex G 25 des surnageants 800 g isolés et extraction de la radioactivité du complexe macromoléculaire exclu sur ce gel, l'analyse chromatographique des extraits est effectuée dans le système de KOCHAKIAN et coll. (141).

- *Sur le plan qualitatif*

Les résultats présentés dans le tableau XXIX prouvent que la testostérone-^{3}H est métabolisée dans tous les organes étudiés et montrent l'hétérogénéité des stéroïdes liés. En dehors de la fraction très polaire située à l'origine du chromatogramme, cinq stéroïdes sont individualisés dans tous les cas étudiés (Figure 23) : ils correspondent successivement aux androstanediols (3α, 5α-androstanediol et 3β, 5α-androstanediol-R_T 0,5), à la testostérone (DHT R_T 1,0), à la 5-α-dihydrotestostérone (R_T 1,8), à la Δ_4-androstène,3-17 dione (R_T 3,1) et à la 5 α-androstane, 3-17, dione (R_T 3,6) témoins. Il faut ajouter la présence d'un composé apolaire migrant en front et masquant généralement l'androstanedione de R_T très voisin. Ces deux composés peuvent être séparés dans le système de KOWARSKI et coll. (147). L'androstanedione ainsi isolé ne représente que 2 à 3 %. L'identité du composé apolaire n'est pas établie.

La testostérone-^{3}H, incubée dans un milieu sans tissu, filtrée sur Sephadex G 25 et extraite dans les mêmes conditions, ne subit pas de métabolisme. Après un cycle expérimental complet, 99,5 % de la radioactivité extraite sont identifiés comme étant de la testostérone.

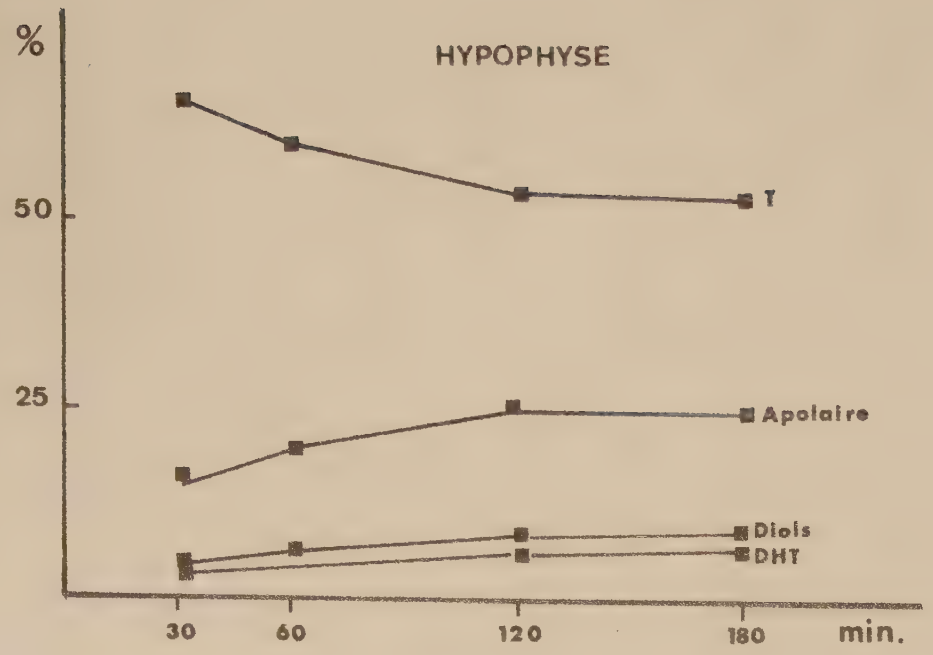
La répartition des androgènes liés aux macromolécules solubles de la prostate diffère nettement de celle des glandes hypophysaires, de l'hypothalamus et du cortex cérébral (Figure 23, Tableau XXIX). Alors que dans ces trois derniers organes la testostérone et le composé apolaire prédominent, dans la prostate la testostérone est rapidement et intensément métabolisée ; les métabolites les plus importants étant la DHT et le corps apolaire non

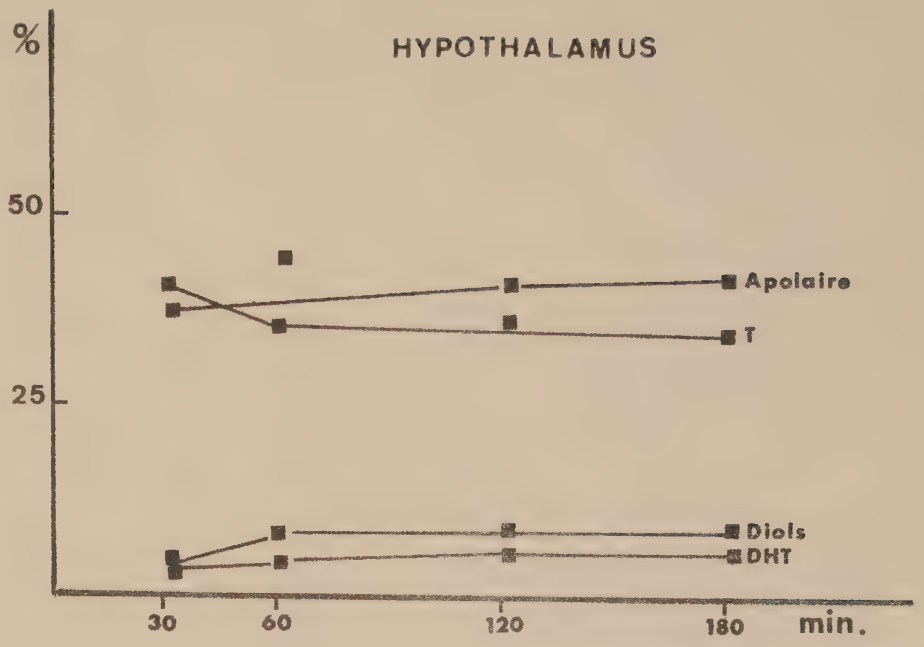
identifié (Tableau XXIX, Figure 23). Par contre, dans la fraction liée du tissu musculaire, la testostérone et le composé apolaire sont seuls présents en quantités notables (Tableau XXIX).

- *Sur le plan quantitatif* -

Les stéroïdes les plus importants dans l'association macromoléculaire de l'hypophyse, isolée sur G 25 sont la testostérone et le composé apolaire. Après 30 minutes d'incubation, la testostérone constitue 64,7 % de la radioactivité totale du chromatogramme et le composé apolaire 16,9 % (Figure 24, Tableau XXIX). L'allongement de la période d'incubation produit une diminution progressive du taux de la testostérone et une augmentation parallèle de celui du composé apolaire (Figure 24). Après 120 minutes d'incubation, il semble qu'un équilibre soit atteint : les taux de ces deux composés restent à peu près constants (Tableau XXIX). A la fin de l'incubation, la testostérone constitue 53,4 % de la radioactivité, le composé apolaire 24,6 %. Les autres métabolites, dihydrotestostérone, androstanediols et androstènedione, en représentent qu'un faible pourcentage de la radioactivité totale associée aux macromolécules hypophysaires, quelque soit la durée de l'incubation (Figure 24, Tableau XXIX). Le taux d'androstènedione, non détectable après 30 minutes d'incubation, reste inférieur ou proche de 2 % pendant toute la période étudiée (Tableau XXIX). La DHT et les androstanediols évoluent parallèlement (Figure 24). Ces deux métabolites, présents en faible quantité après 30 minutes d'incubation, augmentent régulièrement ensuite (Figure 24). Les diols constituent initiallement 4,6 % de la radioactivité totale, puis 8,7 % après une incubation de 180 minutes (Tableau XXIX). Quant à la DHT, elle représente 3,3 % de la radioactivité du chromatogramme après 30 minutes, 8 % après 180 minutes (Tableau XXIX).

Les deux stéroïdes liés principalement aux macromolécules solubles hypothalamiques sont également la testostérone et le composé apolaire. Le





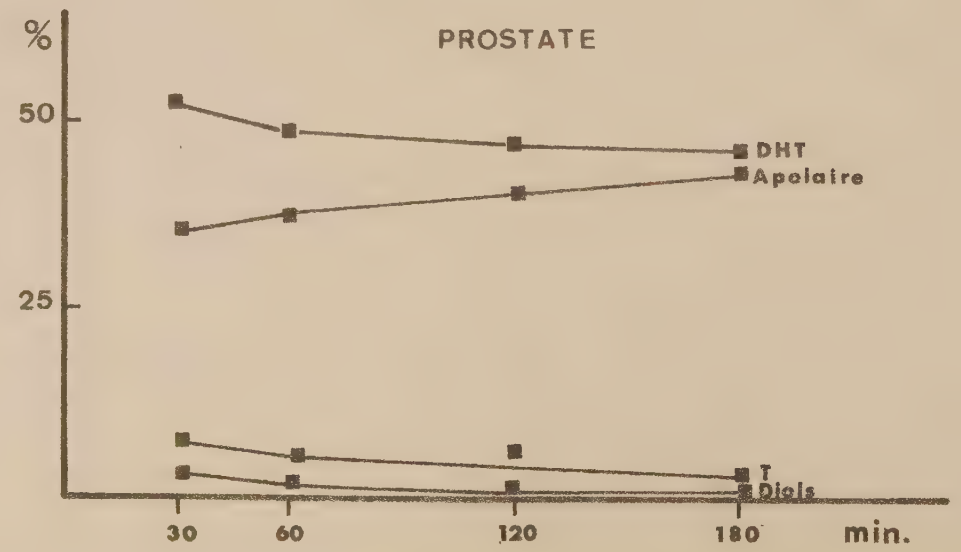


Fig. 24 - Variations des androgènes liés aux macromolécules de l'hypophyse antérieure, de l'hypothalamus et de la prostate de rats normaux, après incubation de coupes à 37°C, en présence de testostérone-^{3}H pendant des temps variables.

En abscisses : temps en minutes
En ordonnées : % de radioactivité.

TABLEAU XXIX

Taux des androgènes liés aux macromolécules solubles du surnageant 800 g de l'hypophyse antérieure, de l'hypothalamus, du cortex cérébral et du muscle de rats normaux après incubation de coupes, à 37°C, en présence de $3,8.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, pendant des temps variables.

Les taux de stéroïdes sont exprimés en % par rapport à la radioactivité totale du chromatogramme (moyenne de deux expériences)(ND = non détectable).

Stéroïdes	Hypophyse				Hypothalamus			
	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	30 min.	60 min.	120 min.	180 min
Composés très polaires	2,8	1,7	2,5	1,5	5,2	3,6	3,9	3,3
Androstanediols	4,6	6,3	8,3	8,7	3,2	8,5	8,2	8,1
Testostérone	64,7	61	54,4	53,4	40,5	36	36,7	34,7
D H T	3,3	7,5	6,2	8,0	5,8	4,1	5,5	5,6
Androstène,3-17-dione	ND	2,1	1,4	1,7	2,3	3,0	3,2	3,2
Androstanedione et composé apolaire	16,9	18,1	26,2	24,6	37,4	44,6	41	42

Stéroïdes	Prostate				Cerveau	Muscle
	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	30 min.	60 min.
Composés très polaires	0,8	0,9	0,8	0,9	5	1,1
Androstanediols	3,2	1,5	2,2	0,8	ND	0
Testostérone	7,6	5,9	6,0	2,7	52	60
D H T	52,4	49,5	48,1	47,2	3,9	0
Androstènedione		2,9	3,5	2,4	5,6	3
Composé apolaire et androstanedione	35,9	38	40,7	44,7	26	23

métabolisme est plus important que dans la glande pituitaire. Après seulement 30 minutes d'incubation de coupes, la testostérone ne représente que 40,5 % de la radioactivité totale du chromatogramme (Tableau XXIX). L'augmentation de la durée de l'incubation entraîne une légère diminution de ce taux, cependant assez stable après 60 minutes (Figure 24). Il est de 36 % après 60 minutes d'incubation, de 34,7 % après 180 minutes (Tableau XXIX; Figure 24). On constate un pourcentage très élevé de composé apolaire, presque égal à celui de la testostérone en 30 minutes. En fonction du temps, la quantité de ce composé s'accroît et devient même supérieure à celle de la testostérone (Figure 24, Tableau XXIX). Après une période d'incubation de 180 minutes, le taux de composé apolaire est de 42 %, celui de la testostérone de 34,7 %. Les autres métabolites représentent de très faibles quantités et varient peu entre 60 et 180 minutes d'incubation (Figure 24, Tableau XXIX). L'androstènedione reste voisine de 3 %, la DHT de 5 %. Les diols qui constituent 3 % de la radioactivité totale après 30 minutes d'incubation, représentent ensuite 8 % jusqu'à la fin de l'incubation (Tableau XXIX, Figure 24). Pour l'hypophyse comme pour l'hypothalamus, la DHT et les androstanediols évoluent parallèlement ; la quantité de diols étant toujours légèrement supérieure à celle de DHT (Figure 24).

A l'inverse de l'hypophyse et de l'hypothalamus, le taux de testostérone lié aux macromolécules solubles de la prostate est inférieure à 10 % de la radioactivité du chromatogramme, même après 30 minutes d'incubation (Tableau XXIX). Il n'est plus que de 2,7 % à la fin de la période d'incubation (Tableau XXIX, Figure 24). Par contre, la DHT représente 52,4 % de la radioactivité liée après 30 minutes d'incubation (Tableau XXIX). Sa teneur tend à décroître légèrement avec la prolongation du temps d'incubation (Figure 24). Le métabolisme de la testostérone est donc intense et très rapide dans cet organe. Le composé apolaire est également présent en

quantités importantes et augmente de 35,9 % à 44 % pendant la période étudiée (Figure 24, Tableau XXIX). Les androstanediols ne représentent que de faibles quantités et diminuent en fonction du temps. Quant à l'androstènedione, son taux reste proche de 3 % (Tableau XXIX).

- Analyse des stéroïdes liés dans le surnageant 105.000 g après incubation de coupes de tissu.

Par chromatographie dans le système de KOCHAKIAN des stéroïdes liés aux macromolécules des cytosols d'hypophyse, d'hypothalamus et de prostate, obtenus après incubation de coupes à 37°C, additionnés de testostérone-^{3}H ($3,8.10^{-8}$ M) les mêmes stéroïdes que dans le surnageant 800 g sont isolés (Tableau XXX). Le pourcentage du composé apolaire est beaucoup plus faible que dans les surnageants 800 g. Il ne représente que 1,1 % pour l'hypophyse, 10 % pour l'hypothalamus et 9,7 % pour la prostate. Dans les fractions liées de surnageants 800 g, les taux étaient respectivement de 16,9 %, de 37,4 % et de 35,9 %. Ceci se traduit par une augmentation en pourcentage de tous les stéroïdes détectés sur les chromatogrammes, mais ne modifie pas la répartition des stéroïdes (Tableau XXX). Pour l'hypophyse et l'hypothalamus, la testostérone reste le principal stéroïde. Pour la prostate, la dihydrotestostérone constitue le métabolite majeur..

TABLEAU XXX

Comparaison entre les stéroïdes liés aux macromolécules des surnageants 800 g et des surnageants 105.000 g isolés après 30 minutes d'incubation de coupes d'hypophyse, d'hypothalamus, de prostate, pendant 30 minutes, en présence de $3,8.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H.

Les taux des stéroïdes sont exprimés en % par rapport à la radioactivité totale du chromatogramme.

Stéroïdes	Hypophyse		Hypothalamus		Prostate	
	S.800 g	S.105.000 g	S.800 g	S.105.000 g	S.800 g	S.105.000 g
Composés polaires	0,8	0,8	5,2	4	0,8	2
Androstanediols	4,6	7,8	3,2	8,9	3,2	1
Testostérone	64,7	81	40,5	53,9	7,6	14,1
D H T	3,3	6,9	5,8	5,1	52,4	67,9
Androstènedione	N.D.	2	2,3	7,5	N.D.	5
Composé apolaire	16,9	1,1	37,4	10	35,9	9,7

N.D. : non détectable.

TABLEAU XXXI

Taux des androgènes liés aux macromolécules du cytosol de l'hypophyse antérieure, de l'hypothalamus, de la prostate ventrale, incubé avec de la testostérone-^{3}H, à 25°C, pendant 30 minutes.

Les taux des stéroïdes sont exprimés en % par rapport à la radioactivité totale du chromatogramme (N.D. : non détectable).

Stéroïdes	Hypophyse	Hypothalamus	Prostate
Composés polaires	12,7		5,5
Androstanediols	N.D.		0,8
Testostérone	34	32	41
D H T	N.D.		3,5
Androsténedione	N.D.		N.D.
Composés apolaires	44	43	45,8

- Analyse des stéroïdes liés après incubation de cytosols.

Après incubation de cytosol d'hypophyse, d'hypothalamus et de prostate, à 25°C, en présence de testostérone-^{3}H, le seul dérivé formé en quantités importantes est le composé apolaire migrant en front du chromatogramme. La testostérone non métabolisée représente 34 % de la fraction liée du cytosol hypophysaire, le composé apolaire 44 %. Les androstanediols, la DHT et l'androstènedione ne peuvent être caractérisés. Une fraction très polaire est présente, à l'origine du chromatogramme, en quantité importante (Tableau XXXI).

Des résultats similaires sont obtenus pour l'hypothalamus et la prostate (Tableau XXXI). Dans le cytosol de cet organe, la DHT et l'androstanediol peuvent être détectés. Ils sont formés en très faibles quantités : 3,5 % et 0,8 % pour la DHT et les diols respectivement (Tableau XXXI).

β) Métabolisme, *in vivo*, de la testostérone-^{3}H dans le cytosol d'hypophyse du rat normal et castré

Nous avons observé les variations du métabolisme après incubations de tissu hypophysaire. Il reste à déterminer si les mêmes métabolites s'accumulent dans l'hypophyse après injection I.P. de testostérone-^{3}H (0,2 µg) et à examiner l'influence de la castration, *in vivo*. Le métabolisme de la testostérone-^{3}H est étudié, simultanément, dans les fractions liées et libres (séparées par filtration sur Sephadex G 25 fine) du surnageant 39.000 g post-mitochondrial provenant d'hypophyses de rats normaux ou orchidectomisés depuis 15 jours.

- *Fractions liées* -

Après chromatographie dans le système de KOCHAKIAN de la radioactivité extraite après filtration sur Sephadex G 25 du surnageant 39.000 g,

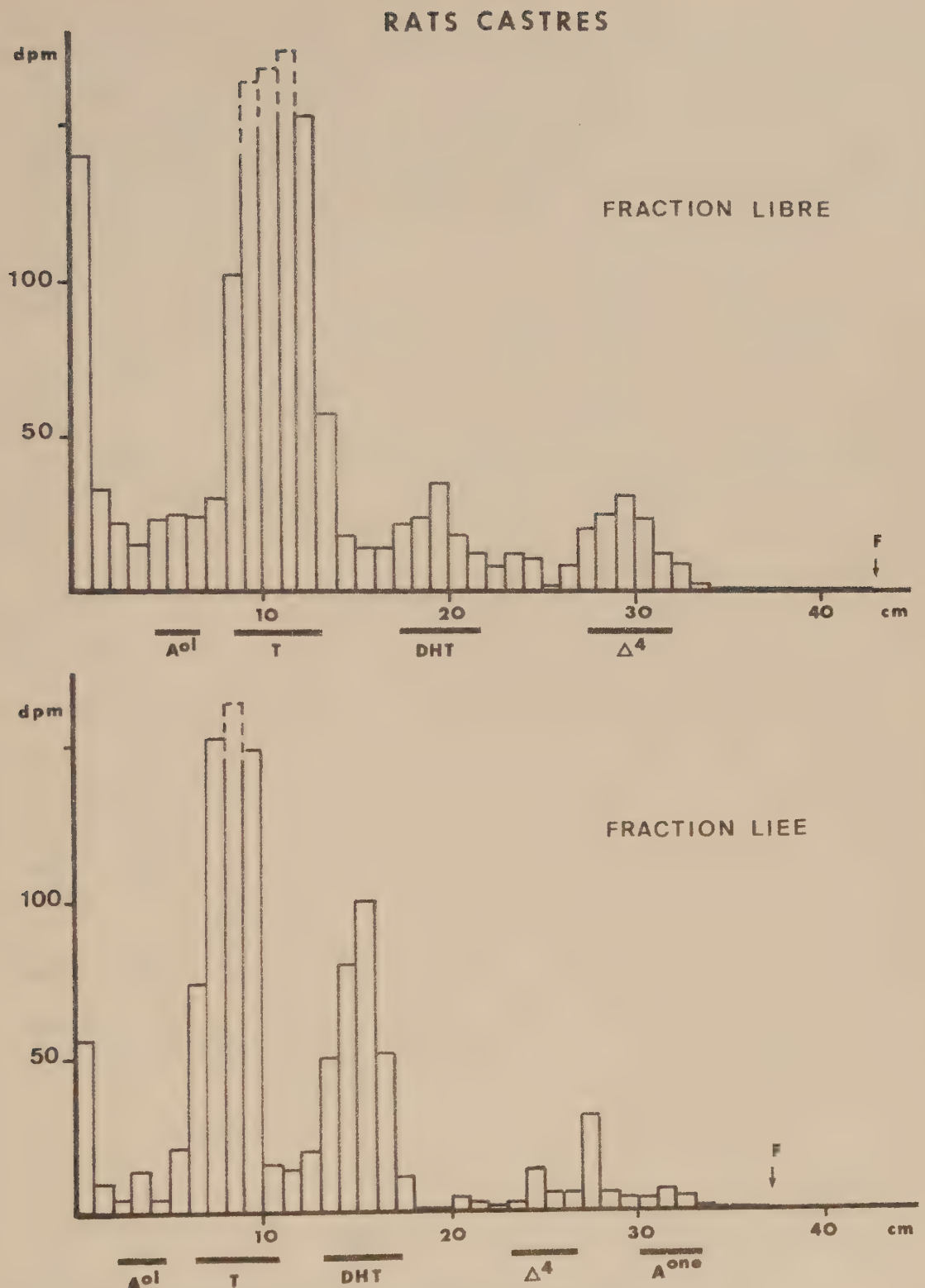


Fig. 25 - Chromatographie sur papier des stéroïdes extraits du S. 39.000 g de l'hypophyse du rat castré, 1 heure après l'injection I.P. de testostérone-^{3}H.

- En ordonnées : radioactivité en dpm par cm
- En abscisses : migration des stéroïdes en cm

La position des stéroïdes témoins sur le chromatogramme est indiquée par un trait plein sous l'axe des abscisses

A^{ol} = androstanediols, T = testostérone, DHT = dihydrotestostérone, Δ^4 = androstènedione, A^{one} = androstanedione.

on constate l'hétérogénéité des androgènes liés *in vivo*. Par comparaison aux stéroïdes de référence, les androstanediols, la testostérone, la DHT, l'androstérone, l'androstènedione et l'androstanedione peuvent être identifiés (Figures 25, 26). Il faut noter également la présence de composés très polaires qui ne migrent pas dans le système utilisé.

L'étude des variations du métabolisme des androgènes liés aux macromolécules du surnageant 39.000 g d'hypophyses de rats castrés est effectuée 5 et 60 minutes après l'injection I.P. de l'hormone mâle. Cinq minutes après l'injection, la testostérone constitue 70 % de la radioactivité de la liaison. Le métabolisme s'accroît en fonction du temps puisque, 60 minutes plus tard, il ne reste que 54 % de la testostérone. La DHT, présente en faiblesquantités cinq minutes après l'injection, devient ensuite le métabolite le plus important quantitativement. Son taux s'accroît de 6,5 % à 25,4 % pendant la période étudiée (Tableau XXXII). Soixante minutes après l'administration de l'hormone, le rapport $\frac{DHT}{T}$ est de 0,48, alors qu'initialement, sa valeur était de 0,095. Le taux des autres composés reste très faible. La radioactivité, correspondant à la migration des androstanediols, semble décroître en fonction du temps. Cinq minutes après l'injection de testostérone, ces stéroïdes représentent 5 % de la radioactivité du chromatogramme, 1,9 % 60 minutes plus tard. Une variation parallèle est observée pour l'androstènedione. Par contre, le taux d'androstanedione devient plus élevé 60 minutes après l'injection de testostérone. L'allongement du temps semble avoir peu d'influence sur les composés très polaires, situés à l'origine du chromatogramme (Figure 25, Tableau XXXII).

Les stéroïdes liés , après injection de testostérone-^{3}H à des rats normaux et castrés, peuvent être comparés. Le métabolisme de la testostérone-^{3}H, administrée à des rats castrés croît en fonction du temps. La comparaison entre les stéroïdes liés aux protéines hypophysaires de rats castrés et

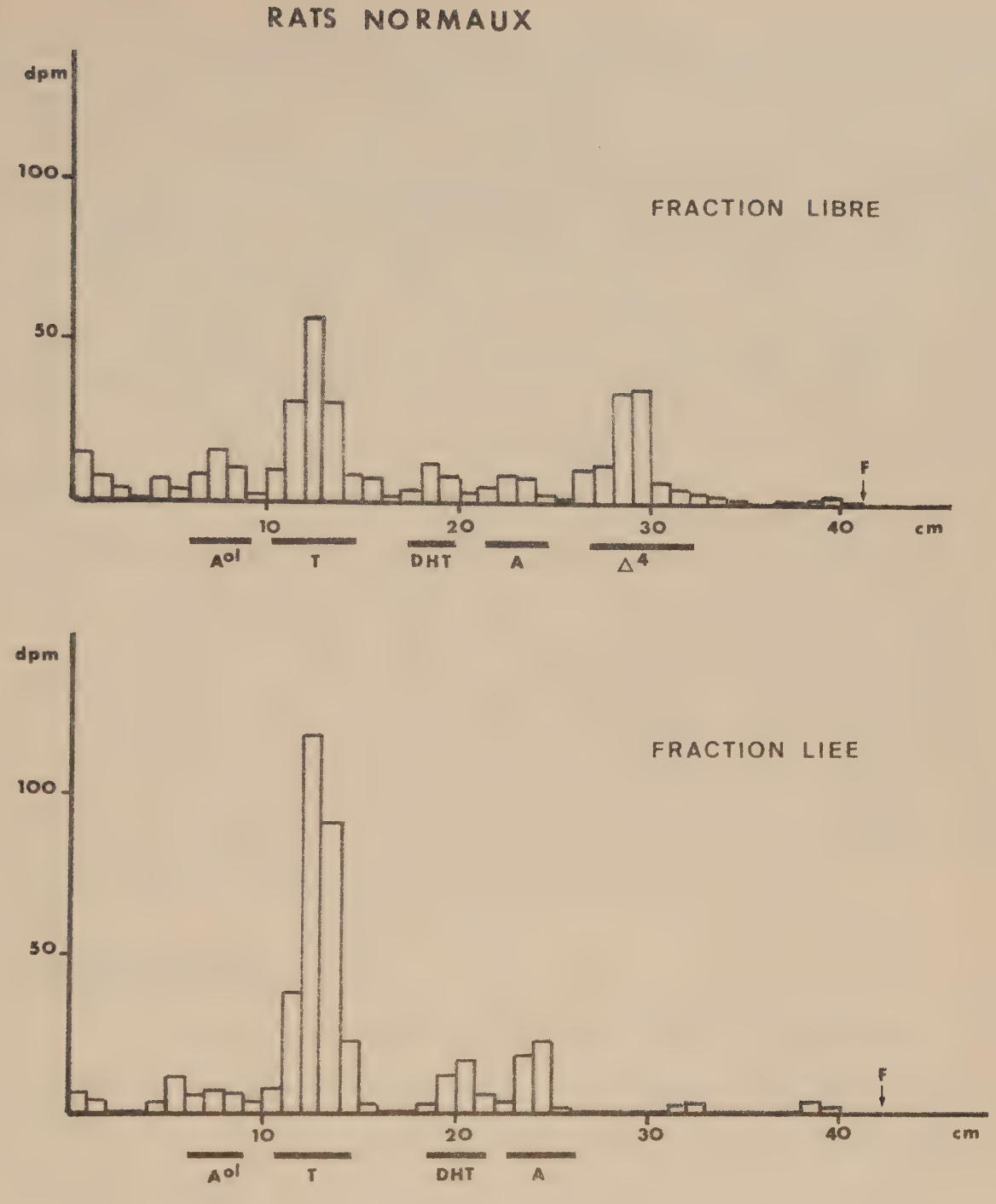


Fig. 26 - Chromatographie sur papier des stéroïdes extraits du S. 39.000 g de l'hypophyse de rat normal, 1 heure après l'injection I.P. de testostérone-^{3}H.

- En ordonnées : radioactivité en dpm par cm
- En abscisses : migration des stéroïdes en cm.

La position des stéroïdes témoins sur le chromatogramme est indiquée par un trait plein sous l'axe des abscisses.

A^{01} = 3 α-androstanediol, T = testostérone, DHT = dihydrotestostérone
A = androstérone, Δ^4 = androstènedione.

normaux est effectuée 60 minutes après l'injection de l'androgène (Tableau XXXII, Figures 25,26). La testostérone reste le composé le plus important qu'elle soit injectée à des rats castrés ou normaux. Dans ce dernier cas, elle représente 63 % de la radioactivité totale du chromatogramme, 54,4 % lorsque les animaux sont orchidectomisés. Dans la fraction liée aux protéines hypophysaires de rats normaux, deux métabolites importants sont présents en quantité presque égale : l'un, de même Rf que l'androstérone, représente 10 % ; il est absent du chromatogramme effectué sur les fractions liées d'hypophyses de rats castrés. Le second est la DHT également présente en quantités notables : 8 % de la radioactivité totale. Le rapport $\frac{DHT}{T}$, égal à 0,13, est beaucoup plus faible que celui des fractions liées d'hypophyses de rats castrés. Le taux des androstanediols est plus élevé dans les fractions liées provenant de rats normaux. Les composés polaires ne varient pas avec l'état de l'animal. Par contre, l'androstènedione et l'androstanedione ne sont pas détectables dans les extraits des fractions liées de surnageants 39.000 g de rats normaux (Figure 26, Tableau XXXII).

- *Fractions libres* -

Les stéroïdes libres du surnageant 39.000 g d'hypohyses de rats normaux ou castrés sont qualitativement identiques à ceux des fractions liées. La testostérone est toujours le composé le plus important quantitativement. Les taux d'androstanediols et d'androstènedione sont plus élevés que ceux des fractions liées aux macromolécules. Par contre, la DHT et l'androstérone sont en proportions plus faibles. Il semble qu'il n'y ait pas de formation d'androstanedione (Tableau XXXII, Figure 25, 26).

L'influence de la gonadectomie sur le métabolisme dans les fractions libres du surnageant 39.000 g hypophysaire est également étudiée. La testostérone non transformée représente 72 % de la radioactivité libre, après injection à des rats castrés. Elle est le métabolite le plus important

TABLEAU XXXII

Taux des androgènes liés et libres du surnageant 39.000 g de l'hypophyse antérieure après injection I.P. de testostérone-^{3}H à des rats normaux ou castrés depuis 15 jours.

Les résultats sont exprimés en % par rapport à la radioactivité totale du chromatogramme (moyenne de 2 expériences).

N.D. : non détectable.

	5 minutes	60 minutes			
	Rats castrés	Rats castrés		Rats normaux	
Stéroïdes	Fraction liée	F. liée	F. libre	F. liée	F. libre
Stéroïdes polaires	7,6	8	8	7	12
Androstanediols	5	1,9	3,5	5	9
Testostérone	70	54,4	72	63	35
D H T	6,5	25,4	4,5	8	7
Androstérone			traces	10	6
Androstènedione	5	1,9	6,5	N.D.	26
Androstanedione et composés apolaires	1,6	5,4		N.D.	

quantitativement. Après injection à des rats normaux de testostérone-^{3}H, la radioactivité est répartie en deux zones d'importance presque égale : la testostérone qui représente 35 % de la radioactivité totale du chromatogramme et l'androstènedione 26 %. Ce composé forme seulement 6 % de la radioactivité dans les fractions libres d'hypophyses de rats castrés. Les androstanediols, la DHT et les composés de départ très polaires constituent également une proportion de radioactivité plus importante dans les fractions libres de rats normaux. Il semble que le métabolisme de la testostérone soit plus important dans les fractions libres du surnageant 39.000 g de rats normaux. Le phénomène est inversé pour les hypophyses de rats castrés (Tableau XXXII, Figures 25, 26).

4 - Mesure de l'activité de la 5α-reductase dans les microsomes d'hypophyse antérieure de rats normaux et castrés.

Les résultats précédents montrent qu'après incubation de coupes de tissu, la testostérone-^{3}H est partiellement métabolisée en dihydrotestostérone. Après injection de cette hormone à des rats castrés, le taux de DHT lié aux macromolécules cytoplasmiques est augmenté de façon significative. De nombreux travaux (144-152) ont fait apparaître que la 5α-reductase est en grande partie localisée dans les microsomes. Pour cette raison, nous avons réalisé des incubations de microsomes d'hypophyses de rats normaux et castrés 1 mois auparavant. Pour cette période de castration, l'hypertrophie et l'hyperplasie de la glande semblent stables.

Après chromatographie dans le système de KOCHAKIAN et coll. (141) des extraits provenant des milieux d'incubation et des microsomes, 6 fractions radioactives peuvent être séparées. La radioactivité de la première fraction correspond à du matériel très polaire qui ne migre pas. Les suivantes correspondent aux androstanediols, à la testostérone, à la DHT, à la Δ_4-androstènedione et à l'androstane,3,17 dione témoins.

Le stéroïde le plus abondant dans le milieu d'incubation et dans le culot de microsomes d'hypophyses de rats normaux adultes est la testostérone. Elle représente 90,7 % des androgènes du milieu d'incubation, 75,5 % de ceux du culot de microsomes (Tableau XXXIII). La formation de DHT dans le milieu et dans le culot de microsomes de rats normaux reste faible : 3,3 et 8,9 % respectivement (Tableau XXXIII). La formation d'androstènedione et de composés très apolaires migrant en front est inférieure à 3 % de la radioactivité totale du chromatogramme. Quant à la transformation en androstanediols, elle ne peut généralement pas être évaluée (Tableau XXXIII).

Lorsque la radioactivité du milieu d'incubation et des microsomes de rats castrés est analysée, on constate que la testostérone non métabolisée constitue toujours la fraction la plus importante, mais le pourcentage de ce stéroïde n'est que de 72,5 % dans le milieu et de 51,7 % dans les microsomes, soit des diminutions respectives de 20 et 32 % par rapport aux extraits de rats normaux (Tableau XXXIII). Le métabolisme de la testostérone est donc nettement accru dans les extraits provenant d'hypophyses de rats orchidectomisés. Les variations métaboliques les plus importantes se situent au niveau de la DHT et des androstanediols (Tableau XXXIII). Dans le milieu d'incubation de microsomes de rats castrés, la DHT représente 14,1 % de la radioactivité, soit une augmentation de 328 % par rapport à celui des rats normaux. L'augmentation est également très importante dans le culot microsomial (+ 236 %) où la DHT constitue 29,9 % des stéroïdes totaux (Tableau XXXIII). Les androstanediols non mesurables dans les extraits de rats normaux forment 6,6 % du milieu d'incubation des microsomes hypophysaires de rats castrés et 7,25 % des microsomes eux-mêmes. La formation des autres stéroïdes est trop peu importante (< 3 %) pour être significative. Il semble que la gonadectomie provoque une diminution du taux d'androstènedione et un accroissement de celui de l'androstanedione (Tableau XXXIII).

TABLEAU XXXIII

Métabolisme de la testostérone-^{3}H ($2,4.10^{-8}$ M) par les microsomes d'hypophyses antérieures de rats normaux et castrés.

Résultats exprimés en pourcentage par rapport à la radioactivité totale du chromatogramme.

Stéroïdes	Milieu d'incubation		Culot de microsomes	
	Normaux	Castrés	Normaux	Castrés
Composés polaires	1,25	1,30	2,2	1,5
Androstanediole	N.D.	6,60	N.D.	7,25
Testostérone	90,7	72,5	75,5	51,7
Dihydrotestostérone	3,3	14,15	8,9	29,9
Androstènedione	2,2	1,6	5,3	3,3
Composés apolaires et androstanedione	0,8	3	3,3	4,2

Ces résultats sont la moyenne de 5 expériences avec 4 rats chacune.

N.D. : non détectable.

Ces résultats montrent donc que l'activité enzymatique de la 5α-reductase de la glande hypophysaire est accrue après orchidectomie. La castration produisant une augmentation moyenne de 25 % du poids de chaque glande et de 59 % des protéines par rapport aux expériences de contrôle, il est nécessaire d'exprimer l'activité de la 5α-reductase en moles de DHT formés par heure et par mg de protéines microsomiales. L'activité spécifique de cet enzyme est de 3,38 p moles/mg dans l'hypophyse de rats normaux et de 8,83 p moles/mg dans la glande des animaux castrés. Le pourcentage d'augmentation est de + 161 %.

5 - Détermination, à l'équilibre, de l'affinité et de la spécificité de la liaison de la dihydrotestostérone et de la testostérone dans le cytosol de l'hypophyse.

Les résultats précédents nous ont permis de constater que la testostérone n'est pas le seul stéroïde associé aux macromolécules du cytosol hypophysaire. La dihydrotestostérone est également liée en proportions importantes, particulièrement après gonadectomie. Pour cette raison il apparaît nécessaire de déterminer l'affinité et la spécificité de la liaison de ces deux stéroïdes pour les macromolécules du cytosol d'hypophyses antérieures de rats prépubères. La détermination de la constante d'association devant être réalisée à l'équilibre, il est nécessaire d'étudier préalablement la liaison de l'hormone en fonction du temps, puis de vérifier le maintien de sa structure. L'activité spécifique est déterminée par filtration sur G 25 medium.

a) Dihydrotestostérone-^{3}H

α) Liaison, à l'équilibre, de l'hormone

L'incubation de fractions de cytosol d'hypophyses de rats prépubères, à 0°C, en présence d'une concentration fixe de dihydrotestostérone-^{3}H ($2,4.10^{-8}$ M), pendant des temps variant de 1 à 24 heures, permet

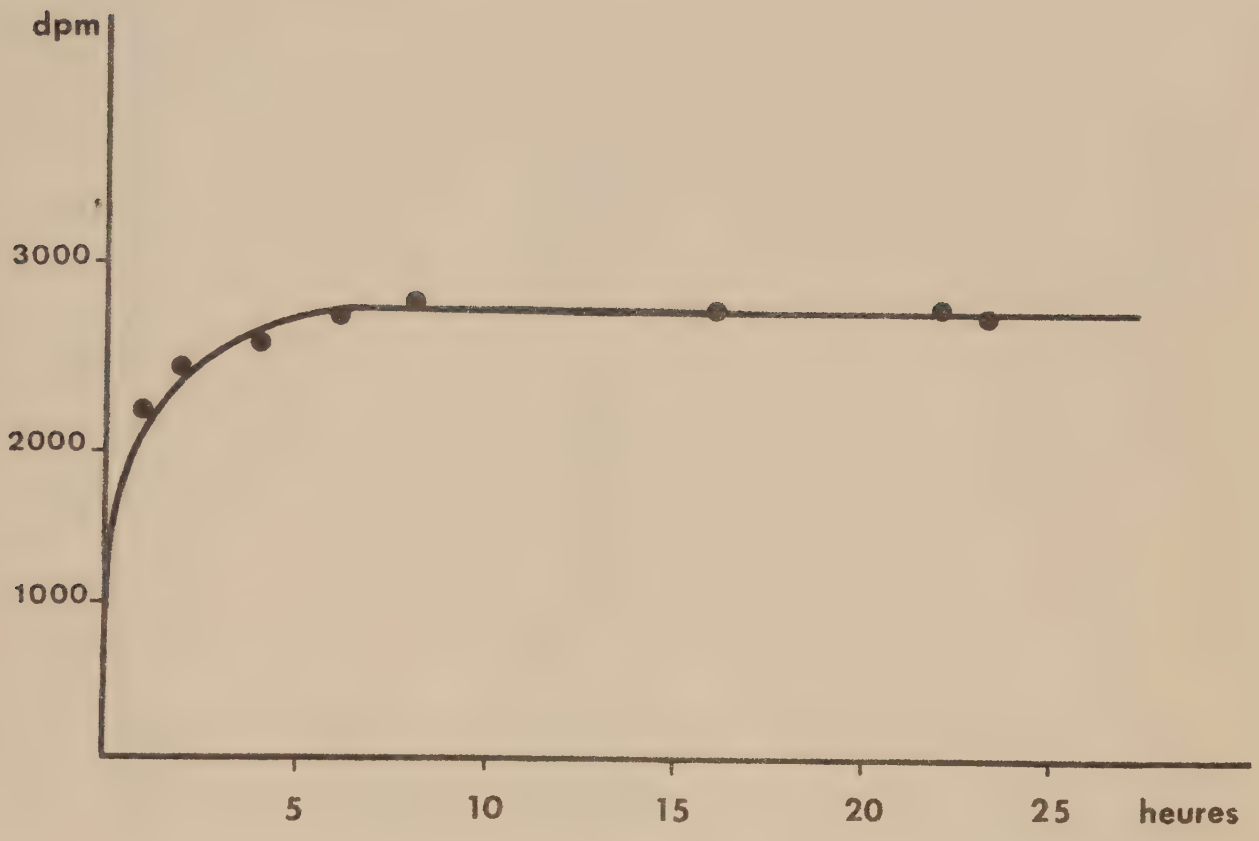


Fig. 27 - Cinétique de fixation de la dihydrotestostérone-^{3}H par les protéines du cytosol hypophysaire.

- En abscisses : temps en heures
- En ordonnées : radioactivité en dpm/mg (A_S).

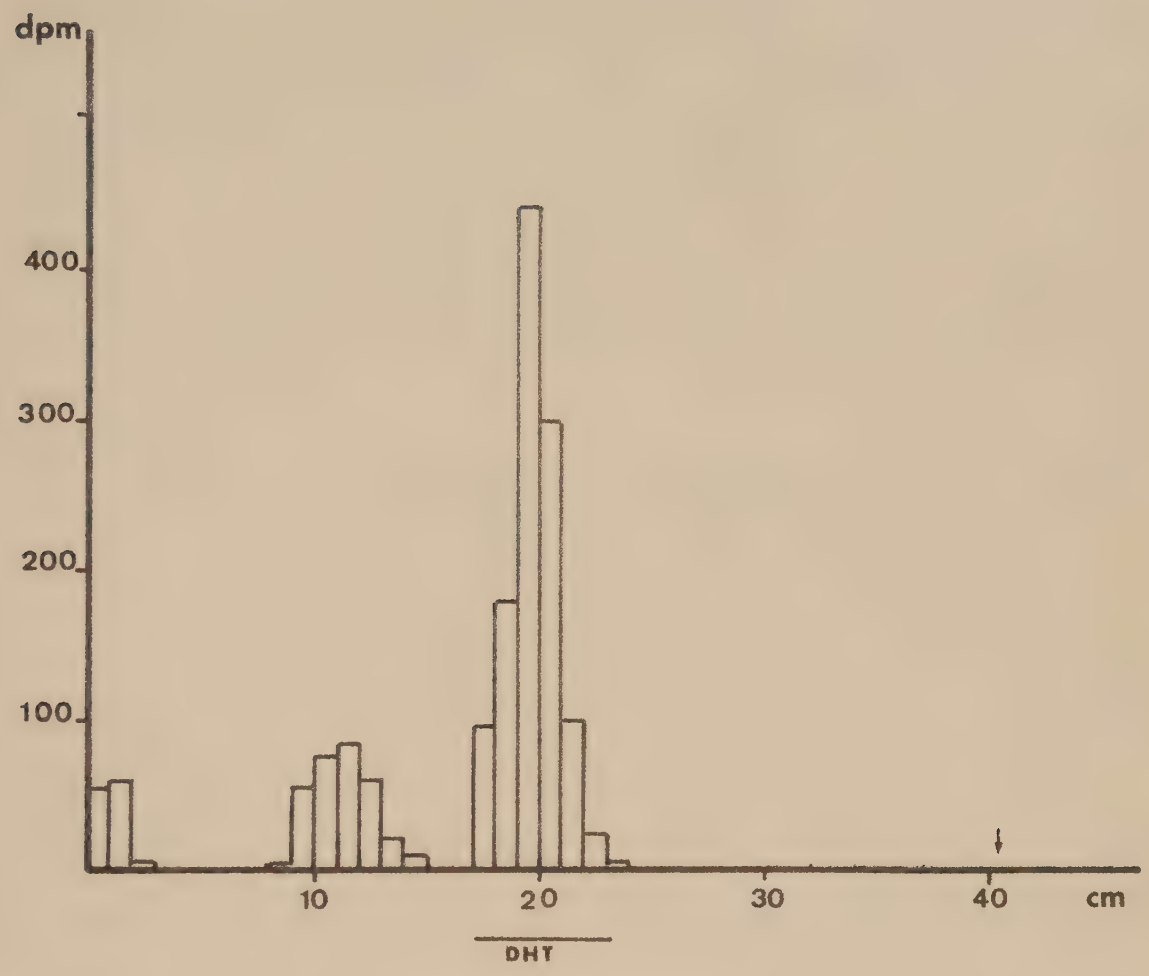


Fig. 28 - Chromatographie dans le système de Kochakian de la fraction exclue sur colonne de Sephadex G 25 médium après incubation du cytosol, à l'équilibre, en présence de DHT-^{3}H.

- En ordonnées : radioactivité en dpm par cm
- En abscisses : migration des stéroïdes en cm.

La position de la DHT témoin sur le chromatogramme est indiquée en trait plein.

de constater que la liaison est maximale après 5 heures d'incubation (Figure 27). Le complexe formé est stable : l'activité spécifique de l'association est encore constante après 24 heures d'incubation. L'équilibre étant atteint en 5 heures, nous avons pour la suite des expériences, fixé la durée des incubations à 6 heures. L'étude chromatographique de la radioactivité liée aux macromolécules du cytosol, à l'équilibre, en présence de $7,0.10^{-8}$ M de DHT-^{3}H montre que la 5α-DHT représente 72 % de la radioactivité totale du chromatogramme. Un pic radioactif, plus polaire que la DHT, constitue 19 % de la radioactivité détectée sur le chromatogramme (Figure 28).

β) Détermination de la constante d'association du récepteur de la dihydrotestostérone-^{3}H

Des fractions de cytosol de concentration protéique est constante (2,9 mg/ml) sont incubées pendant 6 heures à 0°C en présence de concentrations de dihydrotestostérone-^{3}H variant de 10^{-10} à 10^{-7} M (Tableau XXXIV). La figure 29 suggère l'existence de deux types de liaison, une liaison spécifique qui est saturée avec de faibles concentrations de dihydrotestostérone et une liaison non spécifique qui n'est pas saturée dans ces conditions. Aux faibles concentrations hormonales, de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-9} M, le taux d'hormone lié résulte des processus de liaison à la fois spécifique et non spécifique ; ces points correspondent aux cercles ouverts (Figure 29). Pour des concentrations plus élevées, de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-7} M, le composant spécifique de la liaison est saturé et le taux de dihydrotestostérone lié dépend seulement du composant non spécifique. Ces points sont représentés sur la figure 29 par des cercles noirs. La fraction non spécifique de la courbe est soumise à une analyse de régression, ce qui permet d'obtenir une droite $y = 0,026\ x + 0,0019$ avec un coefficient de corrélation (r) de 0,86 (Figure 29). La capacité

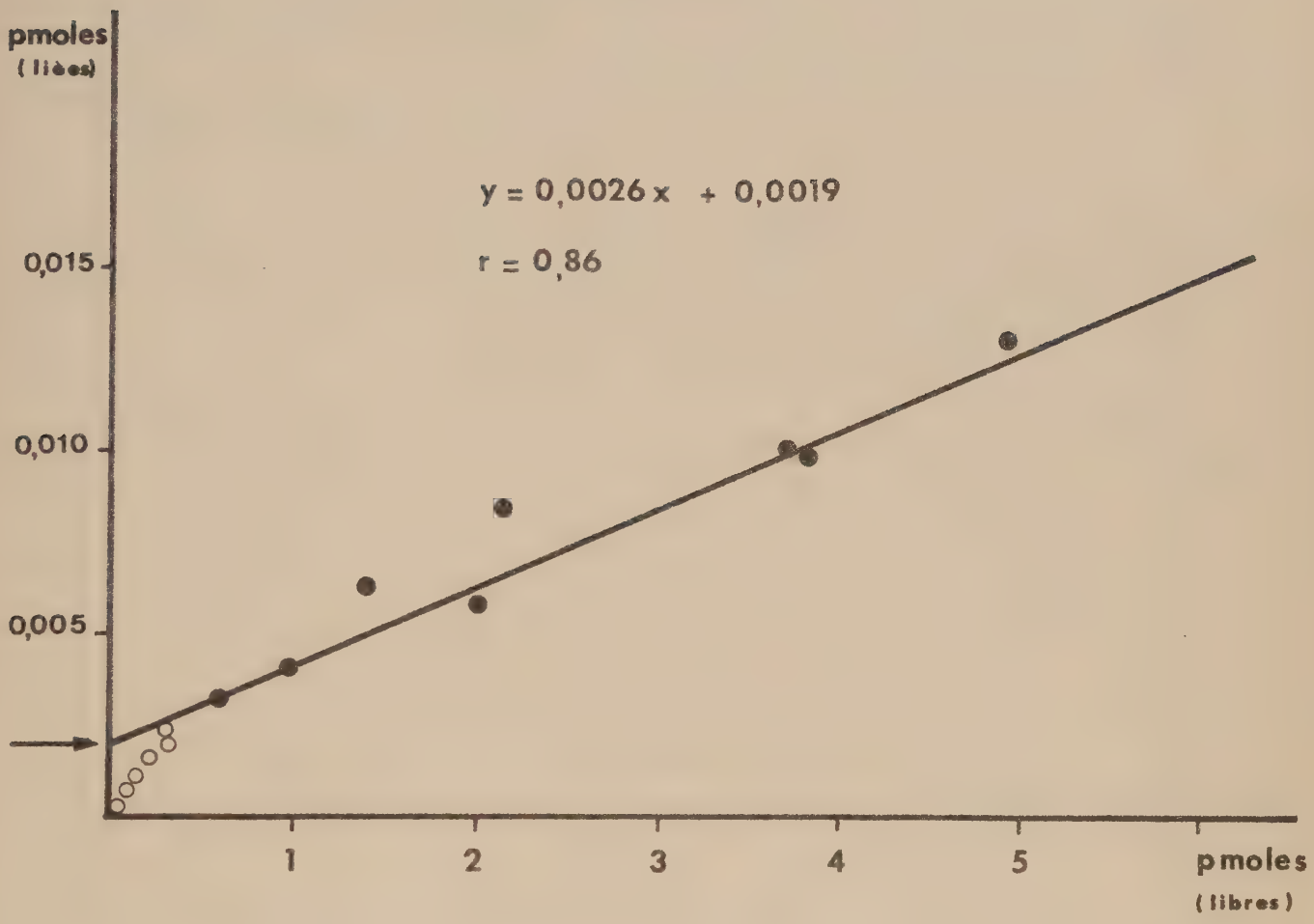


Fig. 29 - Liaison à l'équilibre dans le cytosol d'hypophyse. La capacité de fixation est obtenue de l'interception de la droite de régression avec l'axe des ordonnées (flèche).

- En ordonnées : hormone liée dans le milieu exprimée en pmoles
- En abscisses : hormone libre dans le milieu exprimée en pmoles.

TABLEAU XXXIV

Liaison de la dihydrotestostérone-^{3}H par le cytosol d'hypophyses de rats prépubères, à 0°C, pour des concentrations variables de ce stéroïde.

Résultats exprimés en Moles/litre.

Concentration initiale de DHT-^{3}H	Concentration molaire du stéroïde lié aux protéines = B(Bound)	Concentration molaire du stéroïde libre = U(Unbound)	$\frac{B}{U}$
$2,91.10^{-10}$	$4,4.10^{-12}$	$2,87.10^{-10}$	0,0154
$4,82.10^{-10}$	$5,5.10^{-12}$	$4,767.10^{-10}$	0,0117
$9,63.10^{-10}$	$8,74.10^{-12}$	$9,548.10^{-10}$	0,0092
$1,36.10^{-9}$	$1,38.10^{-11}$	$1,35.10^{-9}$	0,0096
$2,22.10^{-9}$	$1,40.10^{-11}$	$2,21.10^{-9}$	0,0063
$3,90.10^{-9}$	$2,12.10^{-11}$	$3,88.10^{-9}$	0,0054
$6,39.10^{-9}$	$2,86.10^{-11}$	$6,36.10^{-9}$	0,0045
$9,35.10^{-9}$	$4,39.10^{-11}$	$9,31.10^{-9}$	0,0047
$1,343.10^{-8}$	$4,09.10^{-11}$	$1,339.10^{-8}$	0,0031
$1,434.10^{-8}$	$5,80.10^{-11}$	$1,428.10^{-8}$	0,0041
$2,500.10^{-8}$	$7,67.10^{-11}$	$2,493.10^{-8}$	0,0030
$2,535.10^{-8}$	$7,76.10^{-11}$	$2,527.10^{-8}$	0,0030
$3,270.10^{-8}$	$9,11.10^{-11}$	$3,261.10^{-8}$	0,0028
$4,923.10^{-8}$	$1,40.10^{-10}$	$4,909.10^{-8}$	0,0028
$6,448.10^{-8}$	$1,89.10^{-10}$	$6,429.10^{-8}$	0,0029
$1,524.10^{-7}$	$4,52.10^{-10}$	$1,519.10^{-7}$	0,0030
$1,842.10^{-7}$	$5,73.10^{-10}$	$1,836.10^{-7}$	0,0031
$5,530.10^{-7}$	$1,86.10^{-9}$	$5,506.10^{-7}$	0,0032

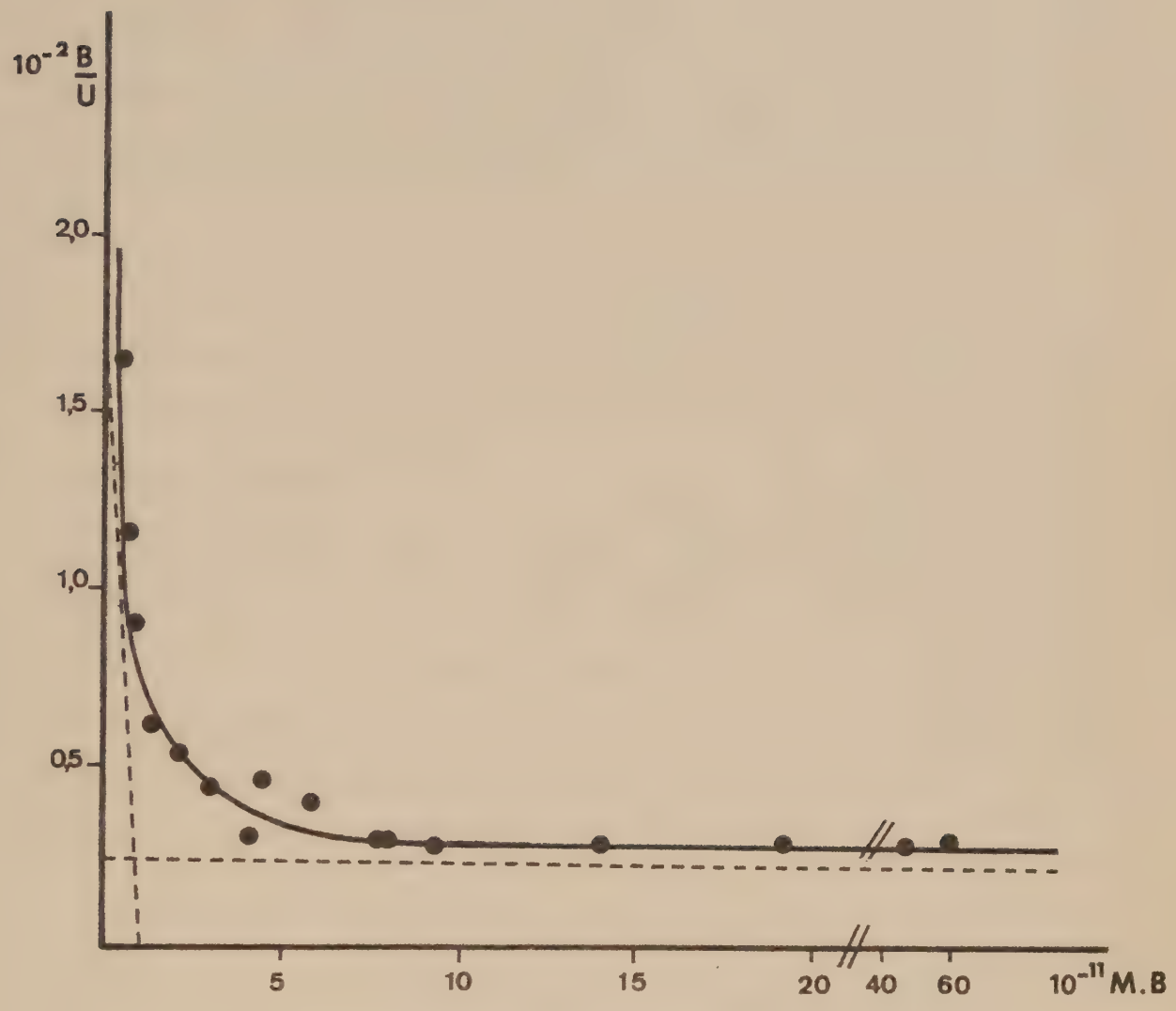


Fig. 30 - Représentation selon Scatchard des liaisons de la dihydrotestostérone (courbe en trait plein).
Détermination selon Rosenthal des composants spécifiques et non spécifiques (droite en pointillés).

- En abscisses : Concentration molaire du stéroïde lié aux protéines (B).
- En ordonnées : Rapport $\frac{B}{U}$ (U = concentration molaire du stéroïde libre).

spécifique de liaison du cytosol hypophysaire est obtenue par l'intersection de cette droite de régression avec l'axe des ordonnées. Ceci est indiqué sur la figure 29 par une flèche. A partir de ces résultats, la capacité spécifique de liaison par mg de protéines peut être calculée. Elle est de 0,0019 pmoles d'après la figure 29, soit 0,0043 pmoles par mg.

Une représentation selon SCATCHARD (153) des résultats du tableau XXXIV produit une courbe confirmant l'existence de plus d'un type de liaison (Figure 30). Cette courbe peut être résolue, selon la méthode de ROSENTHAL (154), en deux droites, l'une correspondant à la partie spécifique, l'autre au composant aspécifique (Figure 30). L'intersection de la droite du composant spécifique avec l'axe des abscisses permet de déterminer le nombre de sites n, et avec l'axe des ordonnées le produit de la constante d'association k et de n. La constante d'association ainsi calculée a une valeur de $1,54.10^{9}\ M^{-1}$, le nombre de sites est de $1,2.10^{-11}$ M, ce qui représente $4,3.10^{-15}$ moles par mg de protéines.

γ) Détermination, par compétition, de la spécificité de la liaison de la dihydrotestostérone

La spécificité du récepteur est étudiée en incubant le cytosol, dans les conditions d'équilibre et de température définies précédemment, avec de la DHT-^{3}H seule ($2,2.10^{-9}$ M) ou avec de la DHT-^{3}H ($2,2.10^{-9}$ M) et un excès de stéroïdes non marqués ($2,2.10^{-7}$M). L'addition d'un excès de DHT froide produit une diminution de l'activité spécifique de 52 % par rapport au témoin incubé avec la DHT-^{3}H seule. Les résultats exprimés en pourcentage d'efficacité de compétition (143), sont donnés dans le tableau XXXV. Il apparaît, que, dans ces conditions, la testostérone est très fortement compétitive pour la liaison au récepteur de la

DHT. La compétition par le 5α-androstane 3α, 17β-diol, le 5α-androstane 3β, 17β-diol, la progestérone et l'oestradiol 17-β est également observée mais à un taux moins important. Par contre, la Δ_4-androstènedione, l'oestradiol-17 α et la corticostérone n'ont aucun effet compétitif sur la liaison de la DHT-^{3}H dans le cytosol hypophysaire

TABLEAU XXXV

Spécificité hormonale du récepteur de la dihydrotestostérone de l'hypophyse antérieure

Stéroïde compétiteur	% d'efficacité de compétition pour la liaison de la DHT-^{3}H pour le récepteur de la dihydrotestostérone (143)
5α-dihydrotestostérone	100
Testostérone	100
5α-androstane,3α,17β-diol	66
5α-androstane,3β,17β-diol	56
Δ_4-androstène,3,17-dione	10
Oestradiol-17α	5
Oestradiol-17β	47
Progestérone	63
Corticostérone	10

b) Testostérone-^{3}H

Une étude parallèle de l'affinité et de la spécificité de la testostérone pour les macromolécules du cytosol a été effectuée en collaboration avec L. Mercier (155).

α) Liaison, à l'équilibre, de la testostérone-^{3}H

L'étude, réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, montre que l'équilibre est atteint après une période d'incubation de 4 heures. La durée des incubations a été fixée à 5 heures pour les expériences suivantes. L'absence de métabolisme important de la testostérone a également été vérifié.

β) Détermination de la constante d'association de la testostérone

Les concentrations en testostérone-^{3}H utilisées varient de 3.10^{-9} à 5.10^{-7} M. La représentation, selon SCATCHARD, des résultats obtenus se traduit également par une courbe biphasique, témoignant de l'existence de plus d'un type de liaison de la testostérone dans le cytosol hypophysaire. Après la résolution de cette courbe en deu.. droites, la constante d'association du composant spécifique peut être calculée : $K_A = 4,2.10^{8}\ M^{-1}$ et le nombre de sites peut être évalué à 8.10^{-11} M soit $2,4.10^{-14}$ moles par mg de protéines.

γ) Détermination de la dissociation de la liaison de la testostérone-^{3}H durant la filtration sur gel de Sephadex G 25 medium

Pour cette expérience, nous avons utilisé 3 colonnes de 1,5 cm de diamètre et de 27,20 et 13,5 cm de hauteur contenant respectivement 9,5, 7 et 4,7 g de Sephadex G 25 médium. Le cytosol, incubé dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de $2,5.10^{-9}$ M de testostérone-^{3}H est divisé en trois fractions qui sont chromatographiées sur les trois colonnes. Les activités spécifiques des associations macromoléculaires sont respectivement de 8,72, 9,17 et $9,68.10^{-15}$ moles par mg de

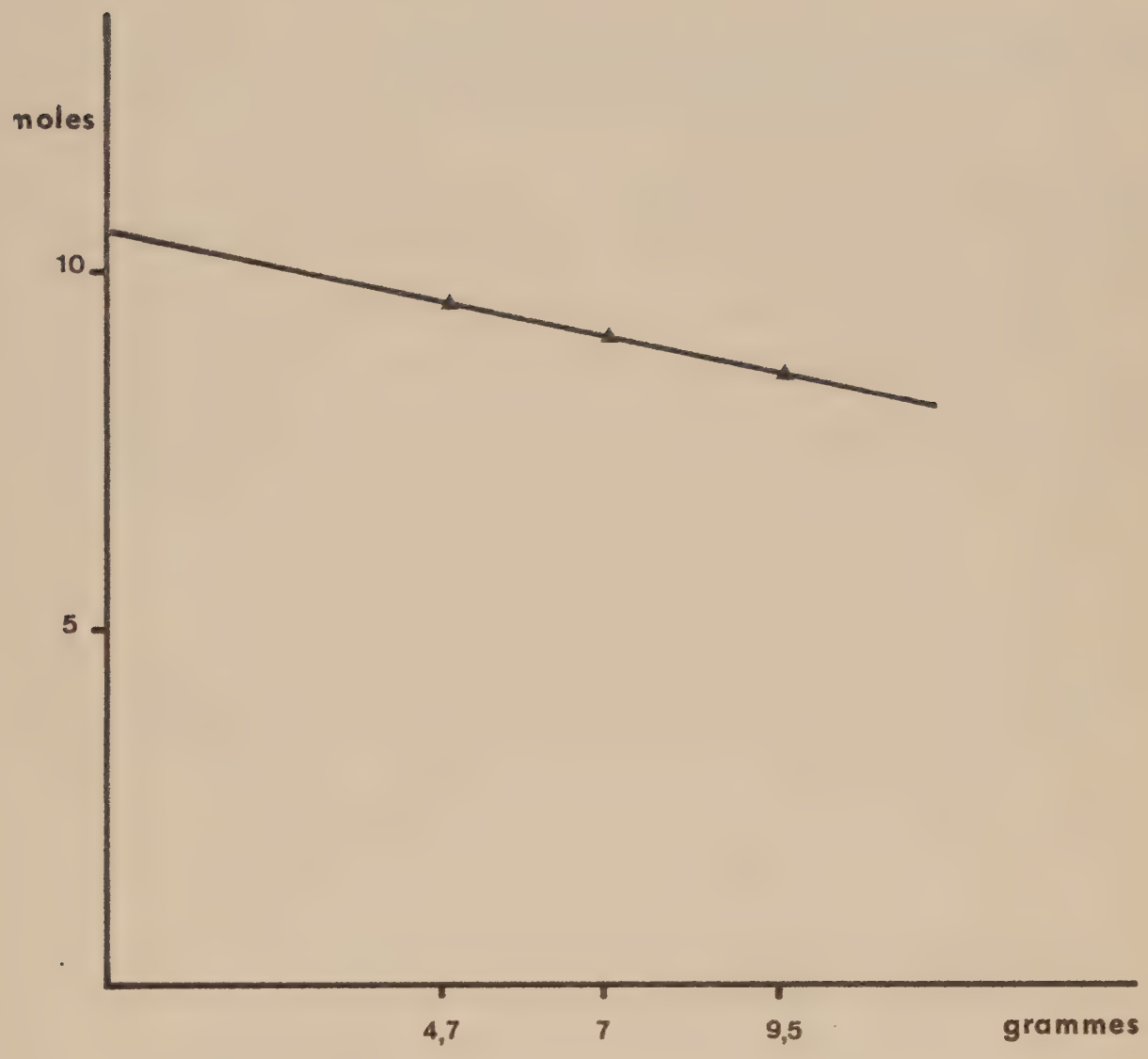


Fig. 31 - Détermination de la dissociation de la liaison de la testostérone-^{3}H par extrapolation des valeurs obtenues après filtration sur 3 volumes différents de gels de Séphadex G 25 médium.

- En abscisses : grammes de Sephadex G 25.
- En ordonnées : Activité spécifique en moles par mg de protéines.

protéines (Figure 31). Par extrapolation, la valeur réelle obtenue de l'inter section avec l'axe des ordonnées est de $10,6.10^{-15}$ moles. Il y a donc une dissociation d'environ 20 % due à la filtration sur le gel.

δ) Détermination, par compétition, de la spécificité de la liaison de la testostérone

Les conditions expérimentales utilisées sont les mêmes que celles de la dihydrotestostérone. Une très forte compétition est obtenue avec la DHT et le 3β-androstanediol, un peu moins importante avec la progestérone. L'efficacité de compétition est plus faible pour le 17β-oestradiol et nulle pour le 3α-androstanediol, le 17-αoestradiol, la Δ_4-androstènedione et la corticostérone.

TABLEAU XXXVI

Caractéristiquesdes constantes d'associations macromoléculaires de la testostérone et de la dihydrotestostérone dans le cytosol d'hypophyses antérieures de rats prépubères.

(M = Moles/litre , n = nombre de sites)

	Testostérone	DHT
K_A	$4,2.10^{8}$ M^{-1}	$1,54.10^{9}$ M^{-1}
K_D	$2,38.10^{-9}$ M	$6,49.10^{-10}$ M
n	8.10^{-11} M 24.10^{-15} moles/mg	$1,2.10^{-11}$ M $4,3.10^{-15}$ moles/mg

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

L'ensemble de ces travaux nous ont permis de confirmer les résultats précédents sur la captation de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus du rat et d'étudier la répartition intra-cellulaire de l'androgène dans ces organes, *in vitro* et *in vivo*.

L'étude de la répartition de la radioactivité entre les culots et les surnageants 800 g, obtenus après incubation de coupes ou d'homogénats d'hypophyses et d'hypothalamus, montre l'existence de différences importantes entre ces deux organes. Les culots 800 g, d'origine hypothalamique, renferment toujours au moins autant de radioactivité que les surnageants 800 g correspondants. A l'inverse, les surnageants 800 g hypophysaires contiennent un taux d'androgène affinité très supérieur à celui des culots 800 g, qui fixent, en moyenne, 10 % de la radioactivité totale de l'organe. Pour ces deux tissus, une proportion élevée de la radioactivité est soluble.

Les variations de température des incubations modifient peu la distribution intra-cellulaire de l'hormone. Pour l'hypothalamus, les modifications de température des incubations de coupes ou d'homogénats n'entraînent pas de variations significatives. Pour la glande hypophysaire, on constate une augmentation du pourcentage de la radioactivité du culot 800 g provenant d'incubations d'homogénats, lorsque la température est abaissée alors que la captation totale de la testostérone-^{3}H est fortement diminuée. Cette augmentation est plus importante après incubation de coupes de cet organe à 0°C. Il est possible que, à 0°C, il y ait accumulation de la radioactivité sur les membranes hypophysaires

qui sont sédimentées à 800 g. Après gonadectomie des animaux, on n'observe pas de modifications de la répartition intra-cellulaire de l'androgène dans l'hypophyse et l'hypothalamus. Lorsque des coupes de ces organes sont incubées, pendant des temps variables à 37°C, la radioactivité du culot 800 g hypophysaire est constante après 60 minutes d'incubation et ne dépasse pas 12 % de la radioactivité totale cellulaire ; celle du culot 800 g hypothalamique est légèrement inférieure à celle du surnageant correspondant, après 30 minutes d'incubation. Après 60 minutes, elle devient supérieure et représente 53 à 55 % de la radioactivité totale de l'organe.

Ces résultats sont confirmés après injection intra-péritonéale de testostérone-^{3}H à des rats normaux et castrés. La distribution de la radioactivité hypophysaire est peu différente de celle observée après incubation de coupes. Le surnageant 800 g renferme 72 % de la radioactivité totale. Le pourcentage de radioactivité du culot 800 g est un peu plus élevé que celui des culots provenant d'incubation de coupes. Cette différence peut provenir d'une fixation plus importante de radioactivité, *in vivo*, par les érythrocytes qui sédimentent à 800 g. Après centrifugation à 105.000 g, la majeure partie de la radioactivité est soluble. En effet, le cytosol contient 78 % de la radioactivité du surnageant 800 g et 56 % de la radioactivité totale. Le culot 105.000 g constitué de microsomes, mitochondries, renferme relativement peu de radioactivité.

Comme nous l'avons montré précédemment, la captation totale de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse est considérablement accrue par l'orchidectomie des animaux. Au niveau sub-cellulaire, il y a une augmentation de la radioactivité du surnageant et du culot 800 g mais la répartition de l'hormone entre ces deux fractions n'est pas modifiée. Le pourcentage de radioactivité du culot 800 g est de 28 % pour les hypophyses de rats normaux, de 22 % pour celles de rats castrés. Après centrifugation à

105.000 g du surnageant 800 g, la majeure partie de la radioactivité reste soluble tant dans le cytosol de rats normaux que dans celui de rats castrés. L'augmentation de la radioactivité est un peu plus importante dans le cytosol de rats castrés puisque le culot 105.000 g provenant d'hypophyses d'animaux castrés ne renferme que 7 % de la radioactivité du surnageant 800 g, alors que celui de rats normaux en contient 22 %.

Quant à l'évolution de la distribution de la radioactivité intra-cellulaire, *in vivo*, en fonction du temps, elle a été étudiée seulement dans le surnageant post-mitochondrial 39.000 g. Dans cette fraction, la radioactivité décroît en fonction du temps parallèlement à la courbe de la captation totale par l'organe.

Au cours des homogénéisations, il peut se produire un éclatament des particules intra-cellulaires et une redistribution de la radioactivité. Pour cette raison, l'étude de la répartition de la radioactivité entre surnageants et culots séparés par centrifugations ne donne pas toujours une information réelle. Nos résultats sont conformes à ceux de M. SAR et W.E. STUMPF qui utilisent une technique différente, l'histoautoradiographie. Ils ont étudié la répartition intra-cellulaire de la radioactivité dans les cellules de l'hypophyse du rat après injection de testostérone-^{3}H. Cinq minutes après l'injection, la radioactivité est distribuée de manière diffuse dans toute les structures du lobe antérieur de la glande. Une heure après l'administration de l'androgène, le taux général de la radioactivité est diminué : seules les cellules gonadotropes sont marquées. Leur cytoplasme contient une proportion de radioactivité assez faible alors que les noyaux sont marqués de façon plus intense (139). Nos résultats sont également en accord avec ceux de ROY et LAUMAS. Ces auteurs ont montré qu'après perfusion de testostérone-^{3}H, 82 % de la radioactivité sont retrouvés dans le cytosol

provenant d'homogénats d'hypophyses antérieures de rats et 9 % seulement dans la fraction nucléaire. Par contre, 41 % seulement de la radioactivité de la prostate et des vésicules séminales sont localisés dans les fractions cytosoliques (126). Après injection d'oestradiol-^{3}H à des rates ovariectomisées, la radioactivité sub-cellulaire est répartie dans l'hypothalamus de la même manière que pour les androgènes (134). La fraction nucléaire hypothalamique contient, en moyenne, 42 à 54 % de la radioactivité totale de l'organe. La distribution sub-cellulaire des oestrogènes dans l'hypophyse est différente de celle des androgènes. La répartition de la radioactivité est à peu près égale dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires (134).

Après injection de progestérone-^{3}H à des rates ovariectomisées, MILGROM et coll. ont montré que la majeure partie de la radioactivité hypophysaire est localisée dans le cytosol (51 %). Le culot 800 g ne contient que 17,7 % de la radioactivité totale (143). Pour l'hypothalamus et l'utérus, les pourcentages de la radioactivité des culots 800 g sont respectivement de 76,8 et 65,7 % (143, 156).

Du point de vue de la répartition de la radioactivité entre cytoplasme et noyaux, l'hypothalamus aurait un comportement proche de celui des organes cibles pour les androgènes. ROY a émis l'hypothèse que les organes cibles de la testostérone pourraient être différenciés des tissus non cibles par la distribution sub-cellulaire de la radioactivité due à la testostérone et à ses métabolites (126). Cependant, les différences observées pourraient provenir simplement d'une constitution du tissu différente.

Dans toutes les fractions 800 ou 105.000 g d'hypophyses et d'hypothalamus, nous avons trouvé l'existence de macromolécules, capables de lier la testostérone-^{3}H. Quelque soit les conditions d'incubation uti-

lisées, nous avons observé dans tous les cas, la présence de deux fractions radioactives après filtration des extraits sur gel de Sephadex G 25 : la première est éluée avec les protéines exclues du gel, la seconde correspond aux stéroïdes libres. Le complexe androgène-macromolécule est obtenu par filtration sur gel du surnageant 800 g ou 105.000 g, préparés après incubation d'homogénats totaux ou de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus. Il est également présent dans les cytosols isolés et incubés en présence de testostérone-^{3}H. Il peut donc se former en l'absence d'éléments structuraux. Pour une même concentration en testostérone-^{3}H, la quantité d'androgène lié par mg de protéines est supérieure lorsque l'hormone est ajoutée au cytosol isolé, la barrière membranaire n'existant plus. Ces résultats confirment que la pénétration de la testostérone n'est pas seulement due à un simple phénomène de diffusion. Il est également possible que l'addition directe de testostérone-^{3}H à des protéines cytosoliques entraîne une fixation aspécifique plus importante de l'hormone.

Cette association macromoléculaire semble correspondre à un processus physiologique puisqu'elle a été mise en évidence, *in vivo*, après injection I.P ou I.C de l'androgène à des rats normaux. Quelle que soit la voie d'administration de la testostérone-^{3}H, nous observons une répartition de la radioactivité soluble en deux fractions comme dans les expériences réalisées *in vitro*. Il faut noter qu'après injection I.C, la quantité d'androgène libre dans l'hypophyse et l'hypothalamus est généralement très faible. Par contre, après administration I.P de testostérone-^{3}H, la radioactivité du complexe androgène-macromolécule ne représente que 10 à 15 % de la radioactivité totale du cytosol.

La présence d'associations macromoléculaires de la testostérone dans l'hypophyse et l'hypothalamus a été peu recherchée. BERTRAND et coll. ont trouvé de telles associations dans les cytosols d'hypophyses et d'hypothalamus, provenant d'incubations de coupes avec de la testostérone-^{3}H (131). Très récemment, O. NAESS et A. ATTRAMADAL ont montré, *in vivo* et *in vitro*,

qu'une proportion importante de radioactivité est liée aux macromolécules des fractions cytosoliques d'hypophyse antérieure, d'hypothalamus et de cortex cérébral, après filtration sur Sephadex G 25 (157). J. KATO et T. ONOUCHI ont montré l'existence de composants liant la 5-α DHT dans l'hypophyse (158) et dans l'hypothalamus du rat impubère (159), par ultracentrifugation sur gradient de saccharose. D'autres auteurs ont recherché la présence d'une liaison de la 5-α DHT dans le cytosol d'hypophyses et d'hypothalamus de rats adultes et ont séparé les fractions liée et libre par gel de Sephadex LH 20 (160).

L'incubation d'homogénats d'hypophyses et d'hypothalamus de rats normaux, en présence de testostérone-^{3}H, et à des températures variables montre la labilité de la liaison macromoléculaire de l'androgène. L'élévation de la température du milieu d'incubation des homogénats produit, dans les deux organes, une diminution de la quantité d'androgène lié. Cette diminution peut être due, soit à une instabilité de l'association androgène-macromolécule, soit à une variation du métabolisme de la testostérone, soit encore à une destruction partielle du complexe par action d'enzymes protéolytiques. Des conclusions similaires peuvent être déduites des expériences effectuées avec des incubations de coupes d'hypothalamus à 5°C, 25°C et 37°C. Le taux d'androgène lié, dans cet organe, est inversement proportionnel à l'élévation de la température des incubations. Les résultats obtenus après incubations de coupes d'hypophyses sont différents puisque, à 37°C, la quantité d'hormone liée est supérieure à celle observée après incubation à 25°C et à 5°C. Il est possible que la liaison de la macromolécule cytoplasmique hypophysaire avec l'androgène soit plus stable qu'avec l'hypothalamus. Il faut noter également que le poids des hypothalamus étant supérieur à celui des hypophyses, la quantité d'enzymes protéolytiques présente peut éventuellement être plus importante. L'activité

spécifique du complexe androgène-macromolécule, formé dans le cytosol isolé et incubé avec de la testostérone-^{3}H, est également plus élevée à 25°C qu'à 0°C. TOFT et GORSKI ont montré à 0°C un marquage des macromolécules solubles dans l'utérus de rate par l'oestradiol 17β (42). Par contre, ces résultats diffèrent de ceux observés dans le cytosol de prostate ventrale, incubé à 0°C, en présence de testostérone-^{3}H par UNJHEM et TVETER (77), qui ne détectent pas de radioactivité associée aux macromolécules dans ces conditions.

La castration ne modifie pas l'ensemble de ces résultats sur les variations de la liaison androgène-macromolécule. La formation de la liaison est également thermo-dépendante dans ce cas. Nous avons montré que la captation d'androgène est accrue après gonadectomie, particulièrement pour l'hypophyse antérieure. Si la quantité globale d'hormone liée par les protéines hypophysaires est plus importante chez les rats castrés que chez les normaux, l'activité spécifique du complexe est peu différente. Ceci tient, en partie, au fait que la castration des animaux provoque une augmentation du poids de l'hypophyse et un accroissement de son contenu en protéines, DNA et RNA (161). Ces résultats sont confirmés, *in vivo*, après administration I.P de la testostérone-^{3}H. Après castration, l'accroissement de l'activité spécifique du complexe androgénique formé n'est que de 30 %. Par contre, la quantité d'hormone libre dans le cytosol est augmentée de 140 %. L'ablation des testicules entraînant une diminution de la quantité d'androgènes dans l'organisme, il y a probablement libération d'une partie des sites de fixation occupés par l'hormone endogène.

Nous avons également étudié l'évolution du complexe macromoléculaire des androgènes au cours d'incubations de coupes d'hypophyses et d'hypothalamus, en fonction du temps. L'allongement de la durée de l'incubation produit une augmentation de la teneur en androgènes liés dans

l'hypophyse, parallèlement à la captation totale. Par contre, après 60 minutes d'incubation, l'activité spécifique par mg de protéines hypothalamiques reste constante. A l'inverse, l'activité spécifique du cytosol hypophysaire, *in vivo*, décroît progressivement après l'injection. L'hormone libre du cytosol disparaît rapidement. L'étude de la radioactivité nucléaire nous montrera si la diminution des androgènes dans le cytosol se fait en faveur des noyaux.

La coïncidence constante du passage d'une fraction de la radioactivité avec les protéines, après filtration sur gel de Sephadex G 25, peut laisser penser qu'une partie de l'androgène intra-cellulaire est liée à une macromolécule de nature protéique, dans le cytosol. L'association macromoléculaire des androgènes dans le cytosol hypophysaire semble assez résistante aux enzymes protéolytiques. L'action de la trypsine détruit partiellement le complexe formé préalablement dans le cytosol hypophysaire. Dans les expériences que nous avons effectué, la trypsine agit sur le complexe macromolécule-androgène déjà formé, ce qui explique peut-être la diminution assez faible obtenue. L'interaction "hormone-récepteur" stabilise, en général, le récepteur contre la protéolyse (162). Différentes équipes ont apporté la preuve de la nature protéique des récepteurs des hormones stéroïdes dans les organes cibles,utérus, prostate (10, 35). Le complexe macromoléculaire des androgènes, caractérisé dans la prostate ventrale du rat est totalement détruit par la trypsine et la pronase (77). De même, lorsque le cytosol utérin est incubé en présence de pronase ou de trypsine et de progestérone-^{3}H, il n'y a pas de liaison de ce stéroïde avec les protéines de constante de sédimentation 4 S (59). EISENFELD a montré qu'après incubation de cytosol, en présence d'oestradiol-^{3}H et de chymotrypsine, la liaison dans l'hypothalamus, l'hypophyse et l'utérus est fortement diminuée (117).

Des essais ont été effectués pour étudier le comportement du complexe macromoléculaire soluble des androgènes dans l'hypophyse antérieure sur gel de Sephadex G 100 et G 200. L'étude des profils d'élution des protéines et de la radioactivité montre que ce complexe hormone-protéine présente des formes différentes selon les conditions expérimentales. Quand un cytosol d'hypophyses est additionné de testostérone-^{3}H et incubé à 25°C, la radioactivité, après chromatographie sur gel de Sephadex G 100, apparaît associée aux protéines éluées dans le volume d'exclusion de la colonne, donc de poids moléculaire très élevé. Si la même expérience est effectuée à 0°C, la radioactivité associée aux protéines est séparée en deux fractions : l'une est éluée dans le volume d'exclusion avec les protéines de poids moléculaire élevé, l'autre est retenue sur le gel et éluée avec celles d'un poids moléculaire inférieur à celui de la sérum-albumine monomère. Après incubation de coupes d'hypophyses dans un milieu contenant la testostérone-^{3}H, seule la fraction protéique éluée après la sérum-albumine est marquée.

Les résultats obtenus après chromatographies sur gel de Sephadex G 200 ont confirmé les résultats précédents. Après incubation de cytosol avec de la testostérone-^{3}H à 25°C, nous trouvons un simple pic radioactif symétrique, élué avec les protéines, très près du volume d'exclusion de la colonne (K_{av} = 0,02 - 0,04). Al'inverse, après incubation de coupes en présence de testostérone-^{3}H et filtration du cytosol sur Sephadex G 200, la radioactivité associée aux protéines est éluée, après la fraction albumine, en un pic également symétrique. Nous pouvons calculer un poids moléculaire apparent de 40.000 pour cette fraction. Il en est de même après injection de testostérone-^{3}H à l'animal. Les K_{av} dans ces deux derniers cas sont identiques. Nous avons donc deux formes : l'une exclue sur gel par incubation directe, l'autre retenue après incubation de coupes ou *in vivo*.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par ultra-centrifugation de cytosol hypophysaire sur gradient linéaire de saccharose 5 - 20 % dans le tampon phosphate 0,05 M, pendant 14 heures à 140.000 g (L. MERCIER, communication personnelle). Les constantes de sédimentation ont été déterminées par référence à des composés standard selon la technique de MARTIN et AMES (163). L'analyse du gradient permet de mettre en évidence deux types d'association macromoléculaire de l'hormone dans le cytosol d'hypophyses de rats castrés depuis 48 heures, incubé à 0°C après addition de testostérone-^{3}H. La première de ces associations, la plus importante, a une constante de sédimentation 4 - 4,5S, correspondant à un poids moléculaire voisin de 70.000. La seconde, ayant une constante de 8 - 8,5S,a un poids moléculaire supérieur à 150.000.

La divergence entre le poids moléculaire déterminé par ultra-centrifugation sur gradient de saccharose et par filtration sur gel de Sephadex tient à plusieurs faits : la forme de la molécule et la tendance des complexes "hormone-récepteur" à former des agrégats par chromatographie sur gels de Sephadex. Pour déterminer le poids moléculaire d'une substance par gel filtration, la structure doit être prise en considération et son comportement peut différer fortement de celui des protéines globulaires de même poids moléculaire, utilisées pour l'étalonnage (150, 164). O'MALLEY constate une différence entre le P.M d'un récepteur cytoplasmique de la progestérone isolé d'oviducte de poule par la méthode de sédimentation et par la technique de gel filtration (165). Il attribue cette divergence à la forme non sphérique de cette protéine. Une forme non-globulaire du récepteur de la 5 α DHT, isolé du cytosol d'épididyme, a été impliquée également par les résultats de HANSSON (166).

ERDOS a constaté que le récepteur utérin de l'oestradiol se présente sous des formes variables selon les conditions d'expérimentation et souligne la tendance du récepteur 8S à former des agrégats (167). La

constante de sédimentation du récepteur utérin est de 8S et le P.M de 330.000 environ dans les extraits bruts lorsque les manipulations pour les obtenir sont réduites au minimum. Cela permet d'espérer un reflet proche de l'état cellulaire. Mais, en soumettant l'extrait brut (8S) à des techniques aussi simples que la filtration sur gel de Sephadex G 200 ou la précipitation par le sulfate d'ammonium, on obtient un extrait partiellement purifié dans lequel le récepteur est inclus dans un ensemble protéique sédimentant comme de très lourds agrégats, les deux formes présentant des propriétés très semblables sinon identiques (167). De nombreuses conditions expérimentales entraînent la formation d'agrégats du récepteur utérin de l'oestradiol : la congélation du tissu ou de l'extrait, le stockage à 0°C, la concentration de l'extrait par ultrafiltration ou dialyse, l'incubation à 30°C, la force ionique du milieu (21).

De nombreux résultats ont montré que les formes 8S des récepteurs des hormones stéroïdes sont instables *in vivo* et tendent à se dissocier en "4S". MAINWARING étudie par ultracentrifugation sur gradient de saccharose le récepteur "8S" soluble de la DHT dans la prostate. Il constate son instabilité *in vivo* : 10 minutes après l'injection du stéroïde, seule la forme "4S" reste présente. Dans les expériences qu'il effectue *in vitro*, une augmentation de la température de 0 à 37°C produit la transformation de la forme "8S" en "4S" (168). BRUCHOWSKY, purifiant partiellement le récepteur cytoplasmique de la prostate, conclut également à l'existence de différentes formes selon les conditions expérimentales (81). Après incubation du cytosol avec la DHT-^{3}H, deux pics radioactifs correspondant à des pics de protéines sont élués par chromatographie sur phosphate de cellulose. Lorsque le cytosol est préparé après injection de DHT-^{3}H à l'animal, seul le pic 2 est marqué (81).

Ces résultats peuvent expliquer la raison pour laquelle nous trouvons une association de la radioactivité avec des protéines de P.M relativement faible après injection de testostérone-^{3}H à l'animal ou après incubation de coupes de tissu. Mais devant les multiples formes sous lesquelles, suivant les conditions expérimentales, se présentent les récepteurs, se pose la question de la forme native dans la cellule.

Ces analyses chromatographiques nous permettent également de montrer la stabilité du complexe des androgènes dans le cytosol hypophysaire. Après chromatographie sur Sephadex G 100 des fractions protéiques liées,préalablement isolées sur Sephadex G 25 fine, 15 % seulement de la radioactivité sont dissociés et retrouvés sous forme d'hormone libre.

L'irriguation sanguine de la glande pituitaire étant particulièrement importante, il a été nécessaire de s'assurer que la liaison des androgènes aux protéines du cytosol n'est pas due à une simple contamination par le sérum. Dans le sérum sanguin humain, la testostérone se lie très fortement, de manière spécifique à la S.B.P. (Sex Steroid-Binding Plasma Protein) (47), plus faiblement à la C.B.G. (Corticostéroid-Binding Globulin) (47, 169) et aspécifiquement à la sérum-albumine (170). Ces trois composants ont tous des constantes de sédimentation voisines de 4S. STØA, par dialyse et analyse sur D.E.A.E. cellulose, a montré que le sérum de rat ne contient pas de S.B.P. et que la testostérone n'est liée qu'à des sites de liaison très facilement dissociables, malgré le fait que ce sérum contienne de la C.B.G. (171). Par chromatographie du sérum de rat ayant reçu une injection de testostérone-^{3}H, nous avons observé un pic radioactif de K_{av} = 0,36 élué avec des protéines proches du K_{av} de la sérum-albumine monomère et une forte proportion d'hormone libre. Ce pic radioactif de K_{av} = 0,36 diffère très nettement de celui des extraits hypophysaires de K_{av} = 0,47, formé

in vivo ou après incubation de coupes de tissu. Ces résultats nous permettent donc d'exclure la possibilité d'une contamination sanguine importante de la liaison des androgènes dans le cytosol.

A ce stade de nos travaux, il est indispensable de connaitre la nature des stéroïdes liés aux macromolécules solubles de l'hypophyse. L'analyse chromatographique des stéroïdes liés du surnageant 800 g de l'hypophyse et de l'hypothalamus, après incubation de coupes de ces organes en présence de testostérone-^{3}H, démontre l'hétérogénéité de cette fraction. Elle est principalement constituée de testostérone et d'un composé, de nature inconnue, moins polaire que l'androstanedione et toujours associé à des macromolécules. En dehors des composés très polaires proches de l'origine du chromatogramme, les androstanediols, la DHT, la Δ_4-androstène,3,17 dione et l'androstanedione peuvent être séparés et identifiés par rapport aux stéroïdes témoins. Ces résultats sont semblables à ceux de PEREZ-PALACIOS qui étudie le métabolisme de la testostérone dans différentes zones du système nerveux central du chien (172). Après incubation des tissus avec de la testostérone-^{3}H, la formation de DHT, d'androstènedione, de 5α androstane,3,17, dione et d'un composé apolaire est notée dans l'hypophyse et l'hypothalamus. La présence de ces dérivés androgéniques dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et également le cerveau prouve que la testostérone est métabolisée dans les centres nerveux supérieurs de régulation. La répartition des androgènes liés aux macromolécules cytoplasmiques de la prostate diffère radicalement de celle de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Alors que chez ces derniers, la testostérone et le composé apolaire prédominent, dans la prostate l'hormone mâle est plus rapidement et plus intensément métabolisée, les métabolites les plus importants étant la dihydrotestostérone et le composé apolaire. Nos résultats concernant la prostate sont conformes à ceux d'autres auteurs (68,76,173),

à ceciprès que nous retrouvons une proportion très élevée de composé apolaire associé aux macromolécules solubles de cet organe. Ce composé pourrait être identique au dérivé, moins polaire que l'androstènedione, signalé par K. ANDERSON et S. LIAO dans le cytosol de prostate, par L. SHOLITON et E. WERK dans le cerveau de rat ou PEREZ-PALACIOS (70, 174, 172). La présence d'un composé très apolaire a été identifiée également dans les prostates maintenues en culture en présence de testostérone (152, 175). Dans les cultures tissulaires, MATSUMOTO obtient 60 % de produits moins polaires que l'androstanedione qui, après hydrolyse potassique, sont séparables en 3α et 3β diols, en testostérone et en dihydrotestostérone. D'après cet auteur, il s'agirait de conjugués de DHT, de 3α et 3β diols (175). D'autres auteurs ont émis l'hypothèse que ce métabolite serait un ester d'acide gras avec un androgène (176).

Les résultats obtenus pour l'hypophyse, l'hypothalamus et la prostate peuvent être comparés à ceux du muscle. Dans ce tissu, la testostérone et le composé apolaire sont seuls identifiés. Des essais effectués pour isoler la DHT dans le tissu musculaire après injection de testostérone se sont révélés également négatifs (177, 178).

Sur un plan quantitatif, les stéroïdes les plus abondants dans la fraction liée du surnageant 800 g de l'hypophyse et de l'hypothalamus sont incontestablement la testostérone et le composé apolaire. Les autres métabolites, DHT comprise, ne représentent qu'un faible pourcentage de la radioactivité totale associée aux macromolécules, quelque soit la durée des incubations. L'allongement de la période d'incubation provoque une décroissance de la testostérone, une augmentation parallèle du produit apolaire. Les autres métabolites, DHT et androstanediols, augmentent parallèlement pendant toute l'incubation, les androstanediols

étant toujours présents en quantité légèrement supérieure. A l'inverse de l'hypophyse et de l'hypothalamus, le taux de testostérone lié aux récepteurs de la prostate est inférieur à 10 % de la radioactivité totale, même après 30 minutes d'incubation, et continue à décroître ensuite. Par contre, la DHT représente 52 % de la radioactivité liée dans le même temps. Sa teneur diminue légèrement avec la prolongation du temps d'incubation. Il en est de même pour les androstanediols présents en faible quantité. L'androstènedione à peine détectable,comme dans l'hypophyse et l'hypothalamus, varie peu. Quant au composé apolaire, sa teneur augmente avec la prolongation du temps d'incubation.

L'analyse chromatographique de cytosols provenant d'incubations de coupes de tissu montre une diminution importante du taux du composé apolaire. Cette disparition se traduit par une augmentation du pourcentage des différents stéroïdes mais ne modifie pas leur répartition de façon importante.

Si dans l'hypophyse, l'hypothalamus et le cerveau, les macromolécules solubles semblent lier les mêmes androgènes que ceux de la prostate, en revanche la testostérone est beaucoup moins métabolisée. Le pourcentage de DHT n'excède pas 8 % dans l'hypophyse et 5 à 6 % dans l'hypothalamus. Quant aux diols, ils ne constituent pas plus de 8 à 9 % de la radioactivité dans ces deux organes. La teneur relativement faible en DHT des fractions liées aux macromolécules hypophysaires et hypothalamiques ne concordent pas avec les conclusions de R. JAFFE concernant

le métabolisme global de la testostérone dans ces organes (178). Cependant nos résultats sont proches de ceux de BERTRAND et coll. qui analysent le métabolisme de la testostérone dans différents organes (131). Après une incubation des tissus pendant 60 minutes, testostérone, DHT et androstènedione sont isolés. La prostate métabolise plus complètement la testostérone que les tissus nerveux avec une formation considérable de DHT. L'hypothalamus et le cortex métabolisent beaucoup moins la testostérone en DHT, l'hypophyse étant intermédiaire entre ces deux groupes de tissu (131). MARTINI parvient à des conclusions identiques : la prostate est la structure qui transforme la testostérone en DHT au taux le plus élevé (179). La glande pituitaire et l'hypothalamus sont aussi très actifs mais la formation de DHT dans ces tissus n'atteint pas les niveaux trouvés dans les organes cibles des androgènes, prostate et vésicules séminales (179). L'ensemble de ces conclusions coïncide avec les concentrations physiologiques en androgènes des tissus (180). Dans la prostate ventrale, la DHT est présente à une concentration un peu supérieure à celle de la testostérone alors que dans l'hypophyse, il y a accumulation de testostérone et une concentration en DHT relativement faible.

Après incubation de cytosols d'hypophyses, d'hypothalamus ou de prostate en présence de testostérone-^{3}H et analyse des stéroïdes liés aux macromolécules, seuls la testostérone, le composé apolaire et la fraction polaire restant à l'origine du chromatogramme peuvent être isolés par chromatographie. L'absence de conversion de la testostérone en DHT dans le cytosol incubé sans addition de cofacteurs a été démontrée pour la prostate (68). Cette transformation est sous la dépendance d'une NADPH 5α -réductase (68).

Le métabolisme de la testostérone-^{3}H, observé dans les expériences *in vivo*, confirme les résultats précédents obtenus après incubation de

coupes de tissu. Après injection intra-péritonéale de testostérone, les principaux métabolites sont les androstanediols, la DHT, des stéroïdes polaires. Des composés de même Rf que l'androstérone, l'androstènedione et l'androstanedione peuvent être également identifiés dans certains cas.

L'étude des stéroïdes liés aux protéines hypophysaires de rats castrés montre un métabolisme important de la testostérone qui s'accroît en fonction du temps. Le taux de testostérone liée décroît alors que s'élève celui du principal métabolite : la DHT. Le rapport $\frac{DHT}{T}$, égal à 0,096, 5 minutes après l'injection, atteint 0,48, 60 minutes plus tard. Les stéroïdes polaires varient peu. Quant aux autres stéroïdes, ils sont présents en faible quantité : l'androstanediol et l'androstènedione diminuent en fonction du temps alors que l'androstanedione s'accroît.

Dans les fractions libres du surnageant post-mitochondrial de rats castrés, les mêmes stéroïdes sont présents mais leur répartition est différente une heure après l'injection. L'androstènedione est le principal métabolite avec les stéroïdes polaires. Quant à la dihydrotestostérone, elle est présente en assez faible quantité. Le rapport $\frac{DHT}{T}$ n'est que de 0,068. Il semble donc que la dihydrotestostérone soit surtout liée aux macromolécules solubles hypophysaires. Le phénomène paraît être inverse pour les androstanediols : le pourcentage de radioactivité de la zone des androstanediols est plus élevé dans la fraction libre que dans la fraction liée. Cependant le rapport $\frac{Diols}{T}$ reste presque identique dans les deux fractions : 0,04 pour la fraction liée, 0,05 pour la fraction libre.

Lorsque la testostérone est injectée à des rats normaux adultes, elle est moins intensément métabolisée dans les fractions liées. Dans ce cas, les deux principaux stéroïdes, présents en quantités à peu près égales, sont la dihydrotestostérone et un stéroïde qui a un Rf identique

à celui de l'androstérone. Le rapport $\frac{DHT}{T}$ n'est que de 0,13,donc beaucoup plus faible que dans les expériences similaires effectuées avec des rats castrés. Par contre, l'androstanediol lié représente un taux plus important: le rapport $\frac{Diols}{T}$ est de 0,14, donc beaucoup plus élevé qu'avec les hypophyses de rats castrés.

Dans la fraction libre du surnageant 39.000 g d'hypophyses de rats normaux, la testostérone ne représente qu'une faible fraction : 35 % seulement de la radioactivité totale. Le principal métabolite est l'androstènedione, toujours plus abondant dans les fractions libres. Il représente 26 % de la radioactivité totale. D'autres métabolites sont également présents en quantité plus importante que dans les autres fractions, liées ou libres, de rats castrés : ce sont les stéroïdes polaires et les androstanediols. Quant à la DHT et à l'androstérone, leur taux,exprimé en pourcentage par rapport à la radioactivité totale, est plus faible que dans les fractions liées. Il semble bien que la DHT soit présente à l'état libre en quantité relativement faible.

Ces résultats sont un peu différents de ceux obtenus par STERN et EISENFELD étudiant le métabolisme global de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure du rat mâle castré (66). La testostérone est métabolisée plus intensément que dans nos expériences. Une heure après son injection, elle ne constitue plus que 29 % de la radioactivité alors que la DHT représente 61 % et les stéroïdes de départ 11 % (66). Ces résultats peuvent également être comparés à ceux obtenus par BRUCHOWSKY dans la prostate (68). Après injection de testostérone-^{3}H à des rats normaux hépatectomisés, 90 % de l'hormone sont convertis en trois métabolites dans le cytoplasme : 3α et 3β diols, DHT et androstérone en faible quantité.

Ces résultats sont confirmés par incubation de microsomes d'hypophyses de rats normaux et castrés, où est partiellement localisée

la 5α-réductase (144, 152). Après incubation de microsomes d'hypophyses de rats normaux en présence de testostérone-^{3}H et d'un système générateur de NADPH, la testostérone est métabolisée dans le milieu d'incubation et dans les microsomes eux-mêmes. Dans le culot microsomial, trois métabolites sont identifiés : le plus important la dihydrotestostérone représente 8,9 % de la radioactivité, l'androstènedione, 5,3 % et l'androstanedione, 3,3 %. Les mêmes métabolites sont présents dans le milieu d'incubation mais à un taux plus faible. Lorsque les incubations sont effectuées à partir d'hypophyses de rats castrés, la transformation de la testostérone en DHT est beaucoup plus importante dans le milieu comme dans le culot de microsomes. Les autres métabolites androstènedione et androstanedione semblent diminuer, alors que les androstanediols sont présents en quantité plus importante. Après gonadectomie, le métabolisme de la testostérone est donc augmenté de façon intense, ce qui se traduit au niveau microsomial par une formation accrue de DHT. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par MASSA et coll. (179) et par EISENFELD et coll. (66). Ces auteurs trouvent une formation de DHT plus importante dans le milieu d'incubation d'hypophyses de rats castrés que dans celui des rats normaux.

Cette transformation plus élevée de la testostérone en DHT et en androstanediols suggère une activité accrue des deux enzymes : 5α-réductase et 3α-hydroxystéroïde déshydrogénase. L'activité 5α-réductase de l'hypophyse, exprimée en pmoles de DHT formée par mg de protéines et par heure est accrue de 162 % par castration. Il est désormais bien établi que la castration provoque une augmentation du poids de l'hypophyse et de sa teneur en protéines (161). Dans nos expériences, nous avons noté une augmentation de 25 % du poids de chaque glande et de 59 % des protéines microsomiales, après castration. Si l'augmentation de l'activité 5α-réductase était seulement due à une hypertrophie ou à une hyperplasie, on pourrait s'attendre à un accroissement similaire de l'activité enzymatique,

ce qui signifie que cette activité resterait constante. Des travaux plus approfondis, effectués par NGUYEN CONG THIEN et JOUAN confirment ces résultats et montrent des valeurs de K_m identiques pour la 5α-réductase microsomiale de l'hyophyse du rat normal et castré (181). De plus, la différence de l'activité enzymatique entre les rats normaux et castrés reste constante pour toutes les concentrations de substrat variant de 10^{-8} M à 10^{-5} M, excluant un effet possible de dilution dû à la présence des stéroïdes endogènes. Quant à la 3α-hydroxystéroïde deshydrogénase, sa localisation est cytosolique, et la formation d'androstanediols observée dans nos expériences provient donc d'une contamination par l'enzyme cytosolique.

Tous les résultats concernant la 5α-réductase concordent avec ceux de Mc EWEN qui signale également une augmentation de la DHT très importante après gonadectomie (182).

La testostérone est donc métabolisée dans l'hypophyse, *in vitro* et *in vivo*, mais le problème de la finalité de ce métabolisme se pose. Selon ROBEL et BAULIEU, quand des métabolites de l'hormone sont formés dans un organe cible, plusieurs possibilités doivent être considérées. Si les métabolites sont inactifs par eux-mêmes, ils peuvent favoriser le renouvellement de l'hormone active par leur excrétion, régulariser le taux de l'hormone active utilisable par le récepteur ou changer la balance métabolique de la cellule. Au contraire, la formation de métabolite(s) actif(s) pourrait conduire au concept de "préhormone" de l'hormone conventionnelle (183). Pour tester le fait que la testostérone soit active par la formation de métabolites aux propriétés androgéniques puissantes, ces auteurs ont étudié l'action de la testostérone et de ses métabolites sur des glandes prostatiques en culture. Leurs conclusions indiquent que l'action de la testostérone peut être en rapport avec sa conversion en différents métabolites actifs, notamment l'androstanolone et le 3β-andros-

tanediol. La DHT tend à provoquer une hyperplasie épithéliale tandis que le 3ß-androstanediol maintient la hauteur épithéliale et stimule l'activité sécrétoire (183).

Le problème est différent dans l'hypophyse et l'hypothalamus où le métabolisme de l'hormone mâle est beaucoup moins intense, mais où s'exercent le contrôle de feed-back des androgènes sur la sécrétion des gonadotrophines. Deux hypothèses peuvent être également posées : la testostérone peut agir par elle-même et, dans ce cas, ces métabolites n'être que des formes d'inactivation ou bien au contraire les métabolites peuvent avoir une action propre.

Quelques auteurs ont essayé de relier le rôle des métabolites à la sécrétion des gonadotrophines dans l'hypophyse. En effet après castration, on observe une augmentation de la LH plasmatique. On a donc pensé que les stéroïdes secrétés par les testicules, principalement la testostérone, devaient avoir un rôle dans la régulation de la sécrétion de la LH. Cependant la testostérone, injectée à des rats castrés, ne peut produire une diminution de la LH plasmatique qu'à des doses supérieures à celles nécessaires pour maintenir le poids normal de la prostate (184). Les autres métabolites formés dans l'hypophyse peuvent donc être mis en cause. JONES et BOYNS ont montré qu'après injection de DHT ou de diols, puis de LH-RH, la suppression de la sécrétion de la LH est plus efficace qu'après injection de testostérone (185). SCHALLY a fait une observation semblable : la DHT supprime plus fortement la stimulation de la sécrétion de la F SH et de la LH, en réponse au LH-RH, que la testostérone (186). MARTINI a montré l'effet inhibiteur des métabolites 5α-réduits de la testostérone sur la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires (187). Il mesure la LH et la F.S.H après injection de stéroïdes et observe que la testostérone ne peut modifier le taux de la LH du sérum alors que la DHT provoque une réduction, faible mais significative, de la LH. Quant au

3β-androstanediol et particulièrement au 3α-diol, ils provoquent une réduction beaucoup plus forte de la sécrétion des gonadotrophines, particulièrement de la LH. Il indique, en plus, qu'il n'y a pas de corrélation entre l'effet androgénique d'un stéroïde et sa capacité à inhiber la sécrétion de LH (187). Les métabolites 5α-réduits de la testostérone étant plus efficaces que l'hormone elle-même sur le bloquage de la libération de la LH et, la pituitaire et l'hypothalamus étant capables de transformer la testostérone en DHT et en 3α-diol , MARTINI conclut que ces métabolites pourraient être les médiateurs de l'effet de feed-back de la testostérone (187). Mc EWEN pense également que le métabolisme de la testostérone dans l'hypophyse et les centres nerveux pourrait être un facteur important dans le contrôle par les androgènes de la sécrétion des gonadotrophines (188). Ses expériences montrent que la capacité de la glande pituitaire à transformer la testostérone en DHT et en 3α-diol se relie au taux de la F.S.H. plasmatique et mieux au taux de la F.S.H. qu'au taux circulant de testostérone (188).

La testostérone et la dihydrotestostérone étant associées aux macromolécules du cytosol hypophysaire, des expériences ont été entreprises pour mesurer, à l'équilibre, l'affinité et la saturabilité de ces liaisons, deux des critères nécessaires pour déterminer la spécificité d'un récepteur. Les résultats montrent l'existence, pour la testostérone, de deux types de liaison dans le cytosol d'hypophyses de rats prépubères : le premier, dont les caractéristiques permettent de croire à l'existence d'un récepteur spécifique soluble de la testostérone, est un composant de haute affinité, à petit nombre de sites ($K_A = 4,2.10^8\ M^{-1}$, $n = 8.10^{-11}\ M$), saturable pour de faibles concentrations hormonales. Le second type est aspécifique et non saturable.

Pour la dihydrotestostérone, la représentation, selon SCATCHARD (153) des résultats expérimentaux produit également une courbe biphasique,

témoignant de l'existence de deux types de liaison spécifique et aspécifique dans le cytosol hypophysaire. Après résolution de cette courbe en deux droites, selon la méthode de ROSENTHAL (154), la constante d'affinité du composant spécifique est de $1,54.10^{9}$ M^{-1} et le nombre de sites $1,2.10^{-11}$ M, soit une concentration de $4,3.10^{-15}$ moles par mg de protéines cytosoliques.

Les valeurs obtenues pour la DHT sont différentes de celles obtenues pour la testostérone. La DHT a une constante d'affinité supérieure à celle de la testostérone et un nombre de sites récepteurs plus limité que celui de son précurseur. Tout récemment KATO et ONOUCHI ont également mis en évidence la présence d'un récepteur de la DHT dans l'hypophyse entière du rat mâle impubère par ultra-centrifugation sur gradient linéaire de saccharose (158). Selon eux, la constante de dissociation du complexe protéine-androgène est de $2,4.10^{-9}$ M et le nombre de sites $5,3.10^{-14}$ moles par mg de protéines. Ces chiffres sont un peu plus faibles que les nôtres mais semblables à ceux que GREENSTEIN et THOMAS obtiennent pour la DHT dans le cytosol hypophysaire du rat mâle adulte (160). Aucune valeur n'a été publiée pour le récepteur de la testostérone dans l'hypophyse du rat mâle mais nos résultats sont proches de ceux déterminés pour le récepteur de la testostérone dans le rein de souris mâle castré où la constante de dissociation est de $1,7.10^{-9}$ M et le nombre de sites $5,6.10^{-14}$ moles par mg de protéines du cytosol (189).

La constante d'affinité de la testostérone et de la dihydrotestostérone pour les macromolécules du cytosol hypophysaire sont du même ordre que celles obtenues pour les récepteurs des hormones sexuelles dans les organes cibles. C'est ainsi, qu'en règle générale, les constantes de dissociation de l'oestradiol pour le récepteur de l'utérus de la rate, de la progestérone pour celui de l'oviducte de poule , de la testostérone pour ceux de la prostate et des vésicules séminales des rats

mâles sont de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} M (190). Ceci est surprenant puisque l'hypophyse est constitué de types cellulaires différents et que seules les cellules gonadotropes semblent répondre aux androgènes (139).

Les études de compétitions ont montré une spécificité importante des récepteurs de la testostérone et de la DHT. Quand le cytosol est incubé avec la DHT-^{3}H et des stéroïdes compétiteurs, seule la testostérone est très fortement compétitive. D'autres stéroïdes tels que la progestérone, l'oestradiol-17β, le 3α- et le 3β-androstanediol sont compétitifs mais à un taux moindre, tandis que l'androstènedione, l'oestradiol-17α et la corticostérone n'ont aucune action inhibitrice sur la liaison. Les résultats sont un peu différents lorsque le cytosol est incubé avec la testostérone-^{3}H et des stéroïdes compétiteurs. La DHT et le 3β-androstanediol sont très compétitifs, la progestérone a également une action compétitive mais à un taux moindre. Le 17β-oestradiol est plus faiblement compétitif. Les autres stéroïdes testés 3α-androstanediol, 17α-oestradiol, androstènedione et corticostérone n'ont pas d'effet inhibiteur sur la liaison. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour le récepteur de la DHT dans le cytosol de prostate. La testostérone est fortement compétitive pour les sites de liaison de la DHT, les oestrogènes et les progestagènes sont moins compétitifs alors que le cortisol ne l'est pas (190). Nos résultats peuvent être comparés à ceux décrits récemment par KATO dans une note préliminaire (158). Quand le cytosol hypophysaire est incubé en présence de 5α DHT-^{3}H et de stéroïdes non marqués, la testostérone et la progestérone sont compétitives, alors que l'androstènedione, l'épiandrostérone, le cortisol n'ont pas d'effet.

En conclusion, nous avons montré, *in vivo* et *in vitro*, l'existence d'une association de la testostérone, dans le cytosol hypophysaire, avec une macromolécule de nature, au moins en partie, protéique. Cette macromolécule se présente sous des formes variables selon les conditions expérimentales : agrégats ou structure de P.M proche de 40.000. Différents critères tendent à démontrer que l'interaction entre la testostérone et la macromolécule réceptrice est spécifique et caractérisent, en même temps, le récepteur. Ces critères sont successivement la stabilité du complexe hormone-récepteur sur colonnes de gels de Sephadex G 100 et G 200 ,

l'élimination de la possibilité d'une contamination de la liaison par le sérum, l'affinité élevée de la testostérone pour son récepteur et la saturabilité par des concentrations hormonales très basses, ce qui indique une capacité limitée pour le composant spécifique. Il faut ajouter que la sélectivité de la rétention de la testostérone injectée et de ses métabolites par la glande hypophysaire indique une certaine spécificité du tissu. Le fait que le principal métabolite de la testostérone, la DHT, possède une liaison saturable de haute affinité pour le cytosol hypophysaire, spécifique, pose le problème de la pluralité éventuelle des récepteurs hypophysaires des androgènes et de leur rôle respectif.

CHAPITRE 4

MISE EN EVIDENCE D'ASSOCIATIONS MACROMOLECULAIRES DES ANDROGENES DANS DES NOYAUX PURIFIES DE L'HYPOPHYSE ANTERIEURE DU RAT.

ETUDE DU METABOLISME NUCLEAIRE DE LA TESTOSTERONE-^{3}H.

S O M M A I R E

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES

1) Animaux

2) Testostérone-^{3}H

3) Injections

4) Méthodes d'incubation

a) coupes

b) noyaux

5) Préparation des noyaux

6) Préparation de sous-fractions nucléaires

7) Chromatographies sur gels de Sephadex

8) Extraction des stéroïdes et analyse chromatographique. Caractérisation de la DHT par cristallisation à activité spécifique constante

9) Méthodes de dosage

a) Protéines

b) DNA et RNA

c) Radioactivité

II - RESULTATS

1) Pureté des noyaux

2) Extraction de la radioactivité et des protéines des noyaux. Préparation de sous-fractions nucléaires

3) Variations de la fixation des androgènes par les noyaux et mise en évidence d'associations macromoléculaires des androgènes dans les noyaux purifiés de l'hypophyse antérieure

a) In vitro

b) In vivo

4) Comportement des associations macromoléculaires sur Sephadex G 200

a) Extractions successives "Tampon-phosphate-NaCl"

b) Extraction NaCl M

5) Etude de la nature des androgènes des noyaux d'hypophyse de rats normaux ou castrés

a) Nature des androgènes présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux après 30 minutes d'incubation du tissu, à 37°C, en présence de testostérone-^{3}H

α) Analyse chromatographique des stéroïdes nucléaires après extraction directe de la radioactivité des noyaux

β) Analyse chromatographique des stéroïdes liés et libres des sous-fractions nucléaires

b) Nature des androgènes présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux ou castrés, incubées en présence de testostérone-^{3}H

c) Nature des androgènes présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux ou castrés une heure après l'injection de testostérone-^{3}H

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

INTRODUCTION

L'étude de la répartition des androgènes dans les fractions subcellulaires nous a montré que la majeure fraction de la radioactivité hypophysaire est soluble, *in vivo* et *in vitro*. A la suite de ces résultats, nous avons pu démontrer la présence de récepteurs des androgènes dans le cytosol de l'hypophyse antérieure, puis étudier quelques caractéristiques de ces liaisons et enfin déterminer la nature des androgènes liés à ces macromolécules cytoplasmiques. Les études de répartition intra-cellulaire des androgènes nous ont également montré que la fraction sédimentée à 800 x g renferme de 10 à 15 % de la radioactivité hypophysaire après incubation de coupes de tissu à 37°C et de 20 à 30 % après injection de testostérone-^{3}H. Ces observations semblent indiquer qu'une partie de la radioactivité de la testostérone-^{3}H transite par le cytoplasme et pénètre dans le noyau. Par conséquent, on peut se demander si, à l'image d'autres organes cibles tels que l'utérus, la prostate, il n'existe pas dans l'hypophyse antérieure du rat mâle un mécanisme "two-step" pour la testostérone. Il nous a donc semblé logique et important, après la mise en évidence de récepteurs spécifiques dans le cytoplasme de l'hypophyse, de rechercher la présence d'associations macromoléculaires dans le noyau de cette glande, et de connaître la nature des androgènes intra-nucléaires.

Dans un premier temps, nous avons donc cherché à obtenir des noyaux d'hypophyse antérieure exempts de contamination importante. Nous avons ensuite recherché, dans ces noyaux, la présence d'associations macromoléculaires, *in vivo* et *in vitro*, et étudié la nature des androgènes liés à ces associations.

I - CONDITIONS EXPERIMENTALES -

1 - Animaux

Des lots de 12 ou 24 rats mâles adultes, de souche Wistar,de 70-80 jours sont utilisés pour ces expériences. Lorsque des rats castrés sont nécessaires, l'orchidectomie est effectuée 10 ou 15 jours avant l'expérience. Des lots de rats témoins "sham-operated" sont également employés. Tous les animaux sont sacrifiés par décapitation sans anesthésie.

2 - Testostérone-^{3}H

Livrée par le C.E.N., elle possède une activité de 42 ou 46 Ci par mMole. La solution initiale benzène-éthanol (9/1) est évaporée à sec sous vide et le résidu est dissous dans l'alcool absolu. Pour les injections, cette solution-mère est concentrée, puis diluée avec une solution de NaCl à 0,9 % et injectée dans un volume de 0,2 ml. Pour les expérimentations *in vitro*, la solution-mère est diluée avec la solution tampon-phosphate 0,05 M, de pH 7,4 ou le liquide de Krebs (129).

La pureté de la solution-mère est testée régulièrement par chromatographie sur papier dans le système de KOCHAKIAN et STIDWORTHY (141).

3 - Injections

Des lots de 24 rats adultes normaux ou orchidectomisés depuis 10 jours sont constitués pour l'étude de la pénétration intra-nucléaire de

l'hormone. Chaque animal reçoit, par voie intra-péritonéale, 0,2 µg de testostérone-^{3}H (31 µCi, $6,9.10^{-10}$ moles). Les injections sont faites avec un décalage de temps de 3 minutes et les animaux sont tués 5, 30, 60, 90 et 120 minutes plus tard. Puis les hypophyses antérieures sont rapidement prélevées et pesées.

Pour les caractérisations des androgènes nucléaires, les extraits provenant de 2 expériences sont rassemblés avant d'être chromatographiés.

4 - Méthodes d'incubation

a) Incubations de coupes d'hypophyses à 37°C

Pour chaque expérience, 12 hypophyses antérieures sont rapidement prélevées, divisées en deux et lavées par une solution de Krebs froid (129). Elles sont incubées dans 3 ml de liquide de Krebs (environ 25 mg de tissu par ml) contenant 75 ng de testostérone-^{3}H ($8,7.10^{-8}$ M). Les incubations sont effectuées à 37°C, sous oxygène, avec une agitation constante, pendant des temps variables. A la fin de la période d'incubation, le milieu est siphonné et les tissus sont lavés 2 fois par 3 ml de liquide de Krebs froid avant d'être homogénéisés.

b) Incubations de noyaux isolés

Les noyaux purifiés, provenant de 12 hypophyses de rats castrés depuis 15 jours ou normaux "sham-operated", sont incubés pendant une heure, à 25°C, en présence d'air, selon les conditions décrites par WILSON et coll. (191). Le milieu d'incubation de pH 6,5 est constitué de saccharose 0,32 M renfermant 1 mMole de KH_2PO_4, 1 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de NADP, 4 mM de glucose-6-phosphate, 2,5 mU de glucose-6-phosphate déshydrogénase et $2,1.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H (1,56 ng).

5 - Préparation des noyaux

Les noyaux purifiés d'hypophyse sont préparés par une méthode basée sur celle de WIDNELL et TATA (192), DUTTON et MAHLER (193) et LAWSON (194). Toutes les opérations sont effectuées à 4°C.

Trois solutions de saccharose sont utilisées :

- Milieu d'homogénéisation : sucrose 0,32 M, $MgCl_2$ 3 mM, ajusté à pH 6,5.

- Milieu de purification : sucrose 2,4 M, $MgCl_2$ 1 mM, ajusté à pH 6,5.

- Solution de conservation : sucrose 0,25 M, $MgCl_2$ 1 mM, ajusté à pH 6,5.

Les tissus hypophysaires (70-80 mg au minimum) sont lavés avec une solution de NaCl à 0,9 % froide puis broyés avec 20 allers et retour du piston le plus large (piston B) d'un homogénéiseur du type Dounce dans un volume de sucrose d'homogénéisation (0,32 M) tel que la concentration soit de 20 % (Pds/vol). L'homogénat est dilué à 50 % avec la même solution et abaissé à une concentration de 0,25 M en sucrose avec de l'eau distillée. Le mélange est rendu homogène par un ou deux allers et retours du piston de l'homogénéiseur (Dounce). Cet homogénat est déposé sur une couche de sucrose 0,32 M (d'homogénéisation) dans la proportion de 1 volume d'homogénat 0,25 M pour 0,6 volume de sucrose 0,32 M. L'ensemble est centrifugé pendant 6 minutes à 600 xg. Le surnageant est décanté et le culot nucléaire brut est remis en suspension dans 0,6 ml du sucrose d'homogénéisation à l'aide du piston de l'homogénéiseur de Dounce. Cette suspension est ensuite additionnée lentement, en mélangeant avec une tige de verre, de 4 ml de sucrose 2,4 M de purification. Le mélange est centrifugé, pendant 75 minutes à 53.500 xg, dans un rotor SW 50 d'une centrifugeuse Beckman L 4. A la fin

de la centrifugation, les noyaux sont sédimentés au fond du tube formant un mince culot translucide. Les érythrocytes, les cellules intactes et les particules cellulaires forment une pellicule au sommet du tube, elle est facilement éliminée avec une spatule. Les parois du tube sont essuyées soigneusement avec du papier filtre et le culot de noyaux est obtenu après décantation à la pipette Pasteur du surnageant.

La pureté de la fraction nucléaire est vérifiée par examen en microscopie optique et électronique et par analyse chimique.

- Examen en microscopie optique - Dans les premiers essais effectués, chaque étape de la préparation a été contrôlée par un examen en microscopie optique. L'étude des noyaux, remis en suspension dans le milieu de conservation, est effectuée en contraste de phase ou après coloration au Bleu de toluidine.

- Examen en microscopie électronique - Le culot de noyaux est additionné d'agar-agar liquéfié au bain-marie. Après refroidissement, le tube de centrifugation, en nitrate de cellulose, est découpé et le bloc agar-noyaux est fixé, pendant 1 heure, avec une solution de glutaraldéhyde tamponnée, puis lavé avec la solution tampon-phosphate. L'échantillon est post-fixé dans du tétraoxyde d'osmium tamponné, puis déshydraté. Il est ensuite traité dans un mélange oxyde de propylène et epon avant d'être finalement inclus dans l'epon A + B. La coloration est faite par l'acétate d'uranyle (2 heures) et le citrate de plomb (30 minutes).

6 - Préparation de sous-fractions nucléaires

Deux méthodes sont utilisées pour extraire les protéines et la radioactivité nucléaires.

a) Extractions successives par une solution de tampon phosphate 0,05 M et une solution de NaCl M

Le culot de noyaux purifiés est remis en suspension dans 2 ml de solution tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4,et homogénéisé dans un appareil de Potter avec un piston de verre. Après centrifugation à 1000 xg, pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant contenant les protéines solubles est décanté et constitue l'extrait "tampon phosphate". Le culot restant est additionné de 2 ml de NaCl M. Après une extraction par agitation magnétique, à froid, pendant 2 heures et une centrifugation à 20.000 xg pendant 20 minutes, le surnageant constitue l'extrait NaCl M. Le culot résiduel est additionné d'une solution de NaOH N (500 µl) et après dissolution, les protéines et la radioactivité sont dosées.

b) Extraction directe par la solution de NaCl M

Le culot de noyaux purifiés est repris par 3 ml d'une solution de NaCl M et la suspension est transvasée dans un tube à centrifugation (Sorvall). Après agitation magnétique, à froid, pendant 2 heures et centrifugation à 20.000 xg pendant 20 minutes, le surnageant est décanté et analysé. Les protéines et la radioactivité sont également dosées dans le culot résiduel.

7 - Chromatographies sur gels

Les extraits provenant du fractionnement des noyaux purifiés sont chromatographiés sur deux types de gels de Sephadex : G 25 ou G 200.

- Sephadex G 25 fine : Nous avons utilisé des colonnes de 27 cm/1,5 cm, contenant 10 g de Sephadex G 25 fine, équilibré dans une solution tampon phosphate 0,05 M ou NaCl Molaire. La fraction contenant les protéines et le DNA est éluée entre le 16ème et le 24ème ml, les

a) Extractions successives par une solution de tampon phosphate 0,05 M et une solution de NaCl M

Le culot de noyaux purifiés est remis en suspension dans 2 ml de solution tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4,et homogénéisé dans un appareil de Potter avec un piston de verre. Après centrifugation à 1000 xg, pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant contenant les protéines solubles est décanté et constitue l'extrait "tampon phosphate". Le culot restant est additionné de 2 ml de NaCl M. Après une extraction par agitation magnétique, à froid, pendant 2 heures et une centrifugation à 20.000 xg pendant 20 minutes, le surnageant constitue l'extrait NaCl M. Le culot résiduel est additionné d'une solution de NaOH N (500 µl) et après dissolution, les protéines et la radioactivité sont dosées.

b) Extraction directe par la solution de NaCl M

Le culot de noyaux purifiés est repris par 3 ml d'une solution de NaCl M et la suspension est transvasée dans un tube à centrifugation (Sorvall). Après agitation magnétique, à froid, pendant 2 heures et centrifugation à 20.000 xg pendant 20 minutes, le surnageant est décanté et analysé. Les protéines et la radioactivité sont également dosées dans le culot résiduel.

7 - Chromatographies sur gels

Les extraits provenant du fractionnement des noyaux purifiés sont chromatographiés sur deux types de gels de Sephadex : G 25 ou G 200.

- Sephadex G 25 fine : Nous avons utilisé des colonnes de 27 cm/1,5 cm, contenant 10 g de Sephadex G 25 fine, équilibré dans une solution tampon phosphate 0,05 M ou NaCl Molaire. La fraction contenant les protéines et le DNA est éluée entre le 16ème et le 24ème ml, les

stéroïdes libres entre les 60ème et 100ème ml. Des fractions de 2 ml d'éluat sont collectées.

- Sephadex G 200 : Les colonnes de gel de Sephadex G 200, équilibré dans la solution tampon phosphate 0,05 M ou NaCl M, ont une hauteur de 75 cm et un diamètre de 1,5 cm. La pression est de 7 cm et le débit de 7 ml/heure. Des fractions d'éluat de 2 ml sont collectées sur lesquelles sont dosées protéines et radioactivité. Ces colonnes de gel sont étalonnées avec des substances de P.M. variables. Les résultats exprimés en termes de K_{av} sont semblables à ceux obtenus précédemment (Chapitre 3, Tableau XXVIII).

8 - Extraction des stéroïdes et analyse chromatographique. Caractérisation de la DHT par cristallisation à activité spécifique constante

a) Extraction des stéroïdes

Les stéroïdes liés aux macromolécules nucléaires sont extraits des éluats de colonnes de Sephadex par le mélange chloroforme-méthanol (2/1), comme précédemment (Chapitre 3, p.111), selon la technique de FOLCH et coll. (146) modifiée par BRUCHOWSKY et WILSON (68). Les fractions contenant la radioactivité libre sont extraites par de l'éther.

La technique de FOLCH et coll. est également utilisée pour extraire les stéroïdes après incubation des noyaux purifiés en présence de cofacteurs et de testostérone-^{3}H.

Dans quelques expériences, les stéroïdes sont extraits par broyage des noyaux dans une solution chloroforme-méthanol (2/1).

b) Analyse chromatographique

Après concentration des phases organiques obtenues par évaporation sous vide, les androgènes sont séparés par chromatographie

dans le système de KOCHAKIAN et coll. (141), sur des bandelettes de 2,5 cm de largeur et de 49 cm de longueur en présence d'étalons internes (testostérone et androstènedione). Lorsque des caractérisations ultérieures de stéroïdes sont nécessaires, des chromatographies préparatives sont effectuées sur une bande de papier Whatman n° 2 de 10 cm de large. La largeur du dépôt est de 6 cm.

c) Caractérisation de la DHT par cristallisation à activité spécifique constante

Tout le matériel est soigneusement lavé au mélange sulfochromique.

La zône radioactive du chromatogramme correspondant à la DHT est repérée après découpage d'une bande latérale du chromatogramme et comptage en scintillation liquide. Elle est découpée en bandes de 8 cm x 2,5 cm épointées. Chaque bande est pincée sur 0,5 cm entre deux lames de verre et éluée par un mélange chloroforme-méthanol (1/1) pendant 24 heures, sous une cloche de verre. Les éluats recueillis dans de petits béchers sont réunis, puis lavés 3 fois par 0,25 volume d'eau afin d'éliminer le propanediol provenant du solvant de la chromatographie. La phase organique est évaporée et l'extrait obtenu, repris par 100 µl de méthanol, est chromatographié dans un système isooctane-méthanol-eau (150-135-15). La radioactivité est comptée sur une bande latérale du chromatogramme et la zône correspondant à la DHT est à nouveau éluée. Une fraction de l'éluat est acétylée, pendant 24 heures, à température ordinaire par un mélange anhydride acétique-pyridine (1/2). Un acétate de DHT témoin est préparé parallèlement. Une chromatographie des acétates de DHT est effectuée dans un système isooctane-phénylcellosolve afin de vérifier l'homogénéité de l'extrait. Si la pureté de l'extrait est jugée suffisante, la cristallisation est entreprise.

La substance marquée est introduite dans le tube à cristallisation et évaporée sous azote. La substance froide, utilisée comme entraîneur est préalablement recristallisée, et ajoutée. Le mélange est dissous par immersion rapide dans un bain-marie à 60-80°C, après addition du solvant. L'activité spécifique initiale est alors déterminée. La cristallisation s'effectue ensuite à froid. Lorsqu'elle est achevée, l'activité spécifique est déterminée à la fois dans les eaux-mères et dans les cristaux. Les eaux-mères, décantées soigneusement à la pipette Pasteur, sont conservées dans de petits tubes. Une à deux gouttes sont déposées dans une capsule en verre tarée (préalablement conservée dans un dessicateur en présence de $CaCl_2$, depuis plus de 24 heures). Ces capsules sont placées dans une boîte de Pétri, recouverte de papier aluminium percé de quelques trous afin que l'extrait puisse sécher. Elles sont conservées de cette manière pendant 24 heures dans le dessicateur fermé. La capsule est rapidement pesée à l'aide d'une microbalance Mettler type M 5 et ensuite introduite dans une fiole de comptage en verre. L'activité spécifique par mg de stéroïdes est calculée. Après décantation des eaux-mères, les cristaux sont séchés avec précaution sous azote avant d'être réduits en une poudre amorphe avec une microspatule. Le solvant restant éventuellement peut être éliminé en plongeant le tube dans un bain-marie à 60-80°C. Le tube contenant les cristaux est recouvert d'un papier aluminium percé de trous et laissé 24 heures au dessicateur. L'activité spécifique est déterminée par pesée de quelques cristaux dans une capsule tarée et comptage en scintillation liquide. Pour que les résultats aient une précision équivalente, le poids des eaux-mères et des cristaux doit être voisin. Pour la caractérisation de la DHT, deux cristallisations successives ont pu être effectuées. La première est effectuée dans du méthanol, la seconde dans un mélange benzène-isooctane (3/1) (solvants Merck).

9 - Méthodes de dosage

a) Protéines

Les protéines sont dosées selon la technique de LOWRY et coll. (142).

b) DNA et RNA

Le DNA est dosé dans l'homogénat initial du tissu et dans les noyaux purifiés. Des prélèvements sont effectués également aux différents stades de la préparation des noyaux et dans les sous-fractions nucléaires. Le DNA est extrait selon la technique de MUNRO et FLECK (195) modifiée par VALOTAIRE et DUVAL (196). L'ADN, l'ARN et les protéines sont précipités par addition d'acide perchlorique concentré (PCA) afin d'obtenir une concentration en PCA égale à 0,3 N. Après centrifugation, les culots sont lavés deux fois par du PCA 0,3 N. Ils sont repris par 1 ml d'eau pour permettre une bonne remise en suspension, puis additionnés d'un volume égal de KOH 0,6 N. L'hydrolyse du RNA est effectuée, pendant une heure, à 37°C. Des prélèvements peuvent être effectués pour doser les protéines. Après refroidissement, les protéines et le DNA sont précipités par du PCA concentré en quantité suffisante pour obtenir une concentration finale de 0,3 N en PCA. La précipitation est obtenue après 45 minutes, à 0°C. Après centrifugation, le RNA est dosé sur le surnageant par la méthode à l'orcinol (197). Le culot de centrifugation est lavé deux fois par la solution de PCA 0,3 N, puis remis en suspension dans 2 ml de PCA 0,6 N. La solubilisation du DNA est obtenue par une hydrolyse à 80°C pendant 10 minutes. Après refroidissement de l'hydrolysat et centrifugation, le DNA contenu dans le surnageant est dosé selon la technique de CERIOTTI (198).

c) Radioactivité

Les éluats de colonne en solution tampon phosphate 0,05 M

sont comptés dans le mélange de BRAY (149). Les solutions de NaCl molaire (1 ml) sont additionnées de 10 ml d'un mélange toluène-triton (P.P.O. 5,5 g, diméthyl POPOP 0,1 g, triton X-100 333 ml, toluène 667 ml). La radioactivité des échantillons repris par la NaOH N est également comptée dans le liquide de Bray (500 µl pour 10 ml). Les comptages doivent être faits rapidement dans ce dernier cas.

Les fioles contenant les capsules de cristallisation sont additionnées de 10 ml de toluène scintillant (P.P.O. 4 g, diméthyl POPOP 0,5 g, toluène q.s.p. 1000 ml).

Les papiers des chromatogrammes sont comptés dans le mélange P.P.O. 5 g, diméthyl POPOP 0,1 g, toluène q.s.p. 1000 ml.

La radioactivité des échantillons étant faible, des temps de comptage de 20 ou 40 minutes sont nécessaires.

II - RESULTATS

1 - Pureté des noyaux

Des contrôles en microscopie optique et des dosages biochimiques de DNA et de RNA, effectués au cours des différentes étapes de la purification des noyaux, permettent de faire quelques remarques sur les conditions de la méthode de préparation.

L'homogénéisation du tissu à l'aide de l'homogénéiseur de Dounce est suffisante avec vingt aller et retour du piston (présentant la cléarance la plus faible) de l'appareil. Elle est plus complète avec 30 aller et retour de ce même piston mais le nombre de noyaux "éclatés" est plus élevé. Une centrifugation de 6 minutes à 600 x g suffit à sédimenter les noyaux bruts. L'examen en microscopie optique du surnageant 600 x g montre la présence de quelques noyaux non sédimentés. Le taux de DNA présent dans cette fraction ne représente que 6 % du DNA de l'homogénat. Quant au culot 600 x g, il ne renferme que très peu de cellules entières.

L'état morphologique des noyaux est amélioré si le culot des noyaux bruts est repris par le sucrose d'homogénéisation avant l'addition de la solution de sucrose 2,4 M de purification qui doit être ajoutée lentement et en mélangeant afin d'éviter un changement brutal de molarité.

L'abandon du rotor 40, utilisé initialement, au profit d'un rotor SW 50 a considérablement amélioré la propreté du culot de noyaux purifiés. Après centrifugation dans le rotor 40, nous obtenions une sédimentation des noyaux le long de la paroi, contaminés ou mal séparés des débris situés à la partie supérieure du tube. Le culot obtenu après sédi-

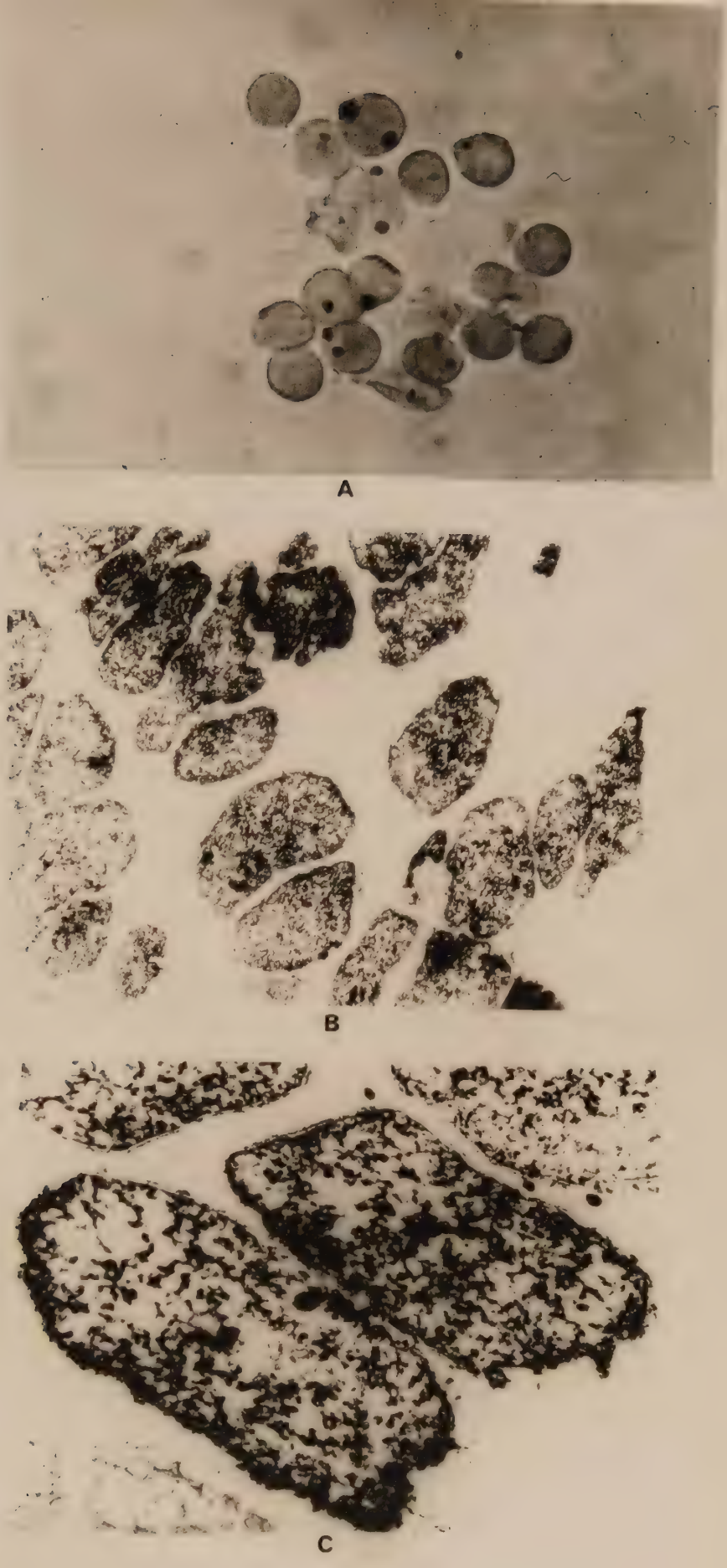


Fig. 32 - Noyaux purifiés examinés en microscopie optique après coloration par le bleu de toluidine (A) et en microscopie électronique (B et C).

mentation en SW est bien localisé au fond du tube et les débris cellulaires de densité plus faible forment une pellicule facile à éliminer à la surface du sucrose. Quant à la durée de centrifugation, elle est de 75 minutes à 53.500 x g. Des essais de centrifugation pendant 120 minutes n'améliorent pas le pourcentage de récupération. Le culot de noyaux est incolore, exempt d'erythrocytes. Les noyaux sont adhérents au fond du tube et se séparent facilement du surnageant. Leur pureté a été vérifiée par des examens en microscopie optique et électronique et par des dosages biochimiques.

L'examen en microcospie optique montre l'absence de cellules entières et de contaminants cytoplasmiques visibles. Les noyaux ont généralement une forme arrondie, quelque fois ovoïde, avec un contour net et 1 ou 2 nucléoles bien visibles. Très peu de noyaux apparaissent lésés (Figure 32 A). L'examen en microscopie optique est insuffisant pour s'assurer, d'une part, de l'intégrité de la structure fine du noyau isolé et pour détecter,d'autre part,la présence de certains contaminants cytoplasmiques. L'examen en microscopie électronique de nos préparations confirme la pureté des noyaux obtenus : absence totale de mitochondries. Il montre que l'intégrité morphologique est conservée en dépit du temps nécessaire à la préparation (1 h 45). Cette intégrité se manifeste par la persistance du nucléole qui est bien différencié, l'homogénéité du nucléoplasme et l'intégrité de la double membrane nucléaire dont le feuillet externe porte des ribosomes (Figure 32 B-C). Il faut noter que le fin réseau visible sur les photos est dû à l'agar-agar. Puisque la présence de contaminants cytoplasmiques augmente le contenu en RNA de la préparation nucléaire, nous pouvons considérer les déterminations de DNA et RNA comme un des critères de l'estimation du rendement, et déterminer le degré de pureté des préparations par les rapports RNA/DNA et protéines/DNA. L'homogénat d'hypophyses antérieures renferme, en moyenne, 3300 µg de DNA, 5044 µg de RNA et 114 mg de protéines par gramme de tissu, ce qui permet de calculer un rapport protéines/DNA égal

à 34,5 et RNA/DNA de 1,53 dans l'homogénat. Le rapport protéines/DNA du culot de noyaux purifiés est en moyenne de 6,2 et le rapport $\frac{DNA}{RNA}$ correspondant est de 0,18 ± 0,01 (moyenne de 6 expériences).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure à un état de purification satisfaisante des préparations de noyaux. Quant au rendement (calculé d'après le contenu en DNA de l'homogénat initial et de la fraction purifiée), il reste assez constant d'une préparation à l'autre et voisin de 36 % (36,5 ± 1,5).

2 - Extraction de la radioactivité et des protéines des noyaux. Préparation de sous-fractions nucléaires

Les essais ont été effectués sur des noyaux purifiés après incubation d'hypophyses en présence de 10^{-8} M de testostérone-^{3}H, pendant 30 minutes, à 37°C. Nous avons utilisé deux techniques d'extraction.

a) Extractions successives par une solution tampon phosphate 0,05 M et une solution NaCl M.

La première extraction provoque un éclatement (vérifié en microscopie optique) des noyaux par broyage dans une solution de tampon-phosphate 0,05 M, pH 7,4. Dans ce cas, les contaminants cytoplasmiques éventuels et les constituants solubles du suc nucléaire doivent constituer les principaux éléments de cette fraction. Les extraits contiennent en moyenne 10 % des protéines et 65 % de la radioactivité nucléaire. Quant au DNA, il est totalement insoluble dans cette fraction. Nous avons ensuite basé l'extraction de la chromatine sur sa dissociation par les sels à force ionique élevée. Des études sur la nucléoprotéine d'érythrocytes de poulet ont montré que la solubilité du DNA et des protéines dépend de la force ionique (199). Pour une force ionique μ= 0,7, 70 % du DNA sont solubilisés,

20 % d'histones sont dissociés de la chromatine. Dans nos extractions, nous cherchions à extraire le maximum de radioactivité. Nous avons choisi une force ionique μ = 1. Les essais ont montré que 42,5 % de protéines sont solubilisés dans cette fraction et 17 % de la radioactivité. Le culot résiduel renferme 47 % des protéines et 15 % de la radioactivité.

b) Extraction directe par une solution de NaCl molaire

Par cette méthode, nous avons traité les noyaux purifiés directement par une solution de NaCl M, et effectués une agitation magnétique, à froid, pendant 2 heures. Après centrifugation à 20.000 x g, l'extrait obtenu très visqueux renferme 57 à 60 % des protéines, 93 % du DNA et 80 % de la radioactivité totale des noyaux.

3 - Variations de la fixation des androgènes par les noyaux et mise en évidence d'associations macromoléculaires des androgènes dans les noyaux purifiés de l'hypophyse antérieure

a) In vitro

Après incubation de coupes d'hypophyses de rats normaux, à 37°C, en présence de $8,5.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, pendant des temps variables, puis préparation de noyaux purifiés, ceux-ci sont extraits par une solution NaCl M. L'extrait obtenu est chromatographié sur une colonne de Sephadex G 25 fine. Les résultats obtenus permettent de déterminer la captation totale nucléaire et les variations de l'activité spécifique de l'association macromoléculaire des androgènes.

Les résultats montrent une pénétration rapide de l'androgène dans les noyaux (Tableau XXXVII). La radioactivité nucléaire totale semble atteindre une concentration maximale après 30-60 minutes d'incubation du tissu et ne plus varier ensuite. La radioactivité de l'extrait NaCl M

TABLEAU XXXVII

Captation de la radioactivité par des noyaux purifiés d'hypophyses de rats adultes normaux après incubation de coupes à 37°C, en présence de $8,5.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, pendant des temps variables.

Résultats exprimés en pg et en moles par mg de protéines.

	5 minutes	30 minutes	60 minutes	120 minutes	180 minutes
Radioactivité totale nucléaire	76 pg $2,6.10^{-13}$ moles	167 pg $5,8.10^{-13}$ moles	175 pg $6,0.10^{-13}$ moles	168 pg $5,8.10^{-13}$ moles	223 pg $7,7.10^{-13}$ moles
Radioactivité extraite par NaCl M	136 pg $4,7.10^{-13}$ moles	183 pg $6,3.10^{-13}$ moles	232 pg $8,0.10^{-13}$ moles	219 pg $7,6.10^{-13}$ moles	
Radioactivité liée dans l'extrait NaCl M	4,0 pg $0,14.10^{-13}$ moles	16,4 pg $0,56.10^{-13}$ moles	20,5 pg $0,71.10^{-13}$ moles	17,0 pg $0,59.10^{-13}$ moles	22,6 pg $0,78.10^{-13}$ moles

semble varier parallèlement (Tableau XXXVIII).L'analyse chromatographique sur gel de Sephadex G 25 de cet extrait montre que la radioactivité est éluée en 2 pics : l'un associé aux macromolécules exclues du gel, l'autre correspondant à l'hormone libre. Après 30 à 60 minutes d'incubation du tissu hypophysaire, l'activité spécifique de la radioactivité liée aux macromolécules extraites par le NaCl M semble stable. Pour ce temps d'incubation, la radioactivité liée représente 8 à 9 % de la radioactivité totale de l'extrait NaCl.

Des extractions successives par la solution tampon phosphate, puis la solution de NaCl M ont également été effectuées et les extraits obtenus chromatographiés sur colonne de Sephadex G 25 fine. Après extraction par le tampon phosphate, la radioactivité est éluée en 2 fractions après filtration sur Sephadex G 25 : l'une exclue avec les macromolécules, l'autre éluée avec l'hormone libre. Le pourcentage de radioactivité liée est très faible : 1,8 % de la radioactivité soluble dans la solution tampon phosphate. La filtration sur colonne de Sephadex G 25 fine de l'extrait NaCl M préparé ensuite montre également la présence d'hormone liée et libre mais le pourcentage d'hormone associée aux protéines est beaucoup plus élevé : 18 % de la radioactivité de cet extrait sont élués sur colonne de Sephadex G 25 fine dans le volume d'exclusion.

b) In vivo

Après injection de testostérone-^{3}H à des rats normaux (0,2 µg par rat) et préparation des noyaux purifiés, on peut constater que le taux de radioactivité extractible par la solution de NaCl M augmente graduellement de 5 à 60 minutes. Le maximum de captation est atteint 60 minutes après l'administration de l'hormone mâle. On observe ensuite une décroissance (Figure 33, Tableau

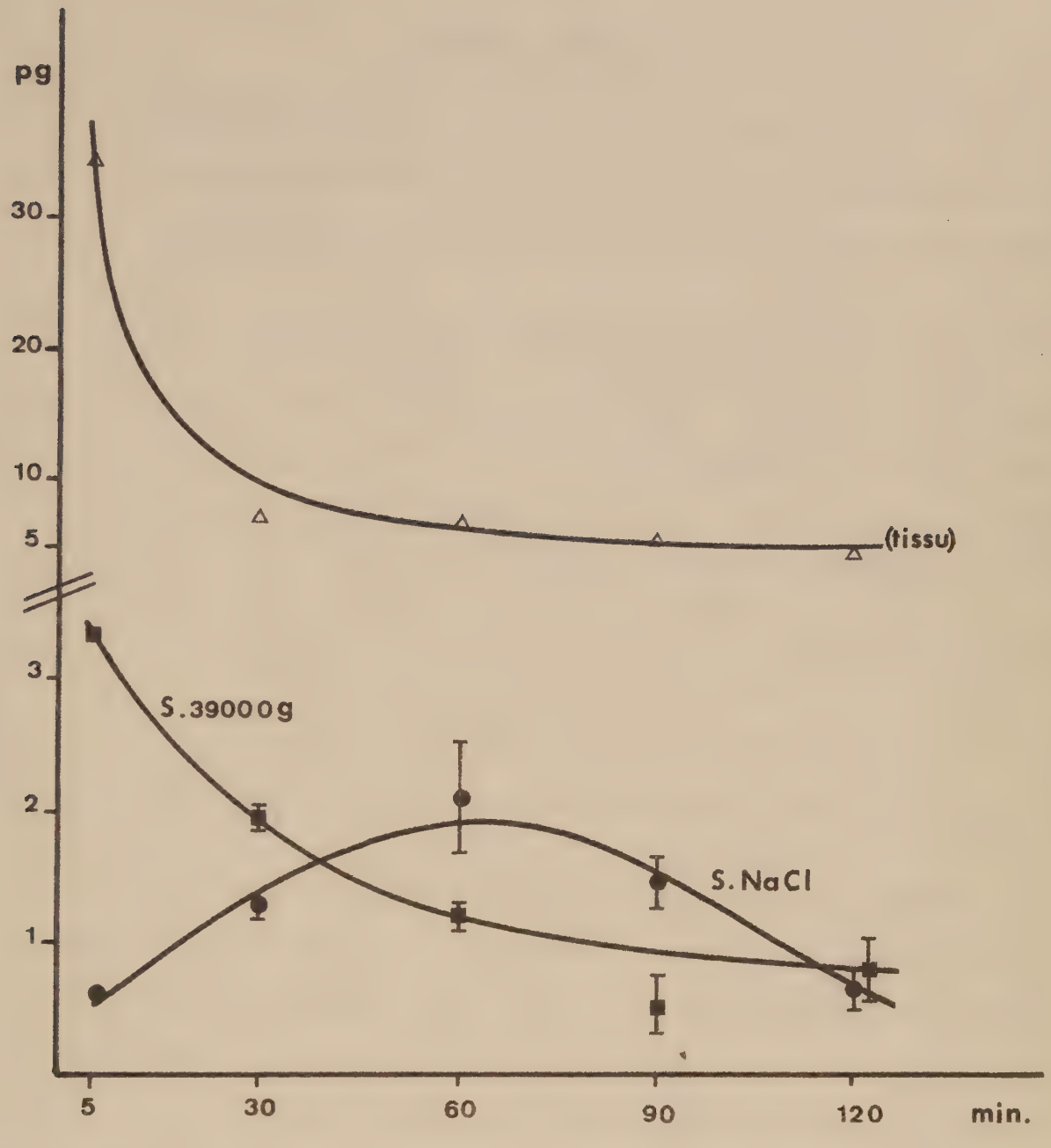


Fig. 33 - Radioactivité du tissu hypophysaire (pg pour 100 mg), du surnageant post-mitochondrial 39.000 g (pg par mg de protéines) et du surnageant NaCl M nucléaire (pg par mg de protéines), après injection I.P. de testostérone-^{3}H à des rats normaux adultes.

- Abscisses : temps après l'injection en minutes
- Ordonnées : Hormone fixée en pg par mg de protéines ou 100 mg de tissu.

TABLEAU XXXVIII

Captation de la radioactivité par les noyaux purifiés d'hypophyses de rats adultes après injection de testostérone-^{3}H, à des temps variables.

Les résultats sont exprimés en pg et en moles par mg de protéines

	5 minutes	30 minutes	60 minutes
Radioactivité extraite par NaCl M	0,64 pg $0,22.10^{-14}$ moles	1,29 ± 0,08 pg $0,45.10^{-14}$ moles	2,08 ± 0,44 pg $0,72.10^{-14}$ moles
	90 minutes	120 minutes	
	1,43 ± 0,20 pg $0,50.10^{-14}$ moles	0,61 ± 0,18 pg $0,21.10^{-14}$ moles	

Ces résultats peuvent être comparés à ceux donnés précédemment (Chapitre 3, p.135) concernant la répartition globale de l'hormone dans le tissu et dans le cytoplasme. La fixation de la radioactivité par la fraction nucléaire diffère fortement de celle du cytoplasme (Figure 33). Alors qu'on observe une décroissance progressive de la radioactivité dans le cytoplasme hypophysaire, la radioactivité nucléaire augmente (Figure 33). Les taux de radioactivité de l'extrait nucléaire et du surnageant post-mitochondrial (Tableau XXXVIII), exprimés pour 1 mg de protéines sont comparables mais cette représentation ne donne pas une idée totalement exacte de la répartition cellulaire. En effet, l'extraction par la solution NaCl M constituant, d'une certaine façon, une purification, l'extrait obtenu correspond à une sous-fraction nucléaire et à une récupération partielle de noyaux. Quant à la radioactivité du culot 20.000 x g restant après extraction, elle est très

faible et les comptages ne peuvent généralement pas être effectués de façon valable.

L'extrait NaCl M, préparé à partir de noyaux purifiés d'hypophyses de rats ayant reçu une injection I.P. une heure avant la décapitation, est chromatographié sur colonne de Sephadex G 25 fine. L'élution de la radioactivité se fait en deux fractions : la première représente la radioactivité associée aux macromolécules et la seconde, l'hormone libre. La radioactivité libre ne représente qu'une faible partie de la radioactivité totale. En effet, en moyenne,61 % de la radioactivité extraite par le NaCl M sont associés aux macromolécules après chromatographie sur Sephadex G 25 fine.

4 - Comportement des associations macromoléculaires nucléaires des androgènes sur Sephadex G 200

La chromatographie sur colonne de Sephadex G 25 ayant permis d'établir qu'après incubation d'hypophyses avec de la testostérone-^{3}H, la radioactivité est associée aux macromolécules nucléaires extraites par la solution tampon phosphate ou NaCl M, nous avons étudié sur colonne de gel de Sephadex G 200 ces différents extraits.

a) Extractions successives "tampon phosphate et NaCl M"

La chromatographie sur colonne de gel de Sephadex G 200 d'un extrait nucléaire "tampon phosphate" permet de séparer une fraction protéique principale éluée dans le volume d'exclusion de la colonne (Figure 34 C). Les fractions éluées ensuite ne représentent que de très faibles quantités à peine détectables par la méthode de LOWRY (142). A ce pic protéique, élué dans le volume exclu de la colonne, est toujours associé un pic de radioactivité (Figure 34 C). L'hormone libre est éluée ensuite (K_{av} = 0,95).

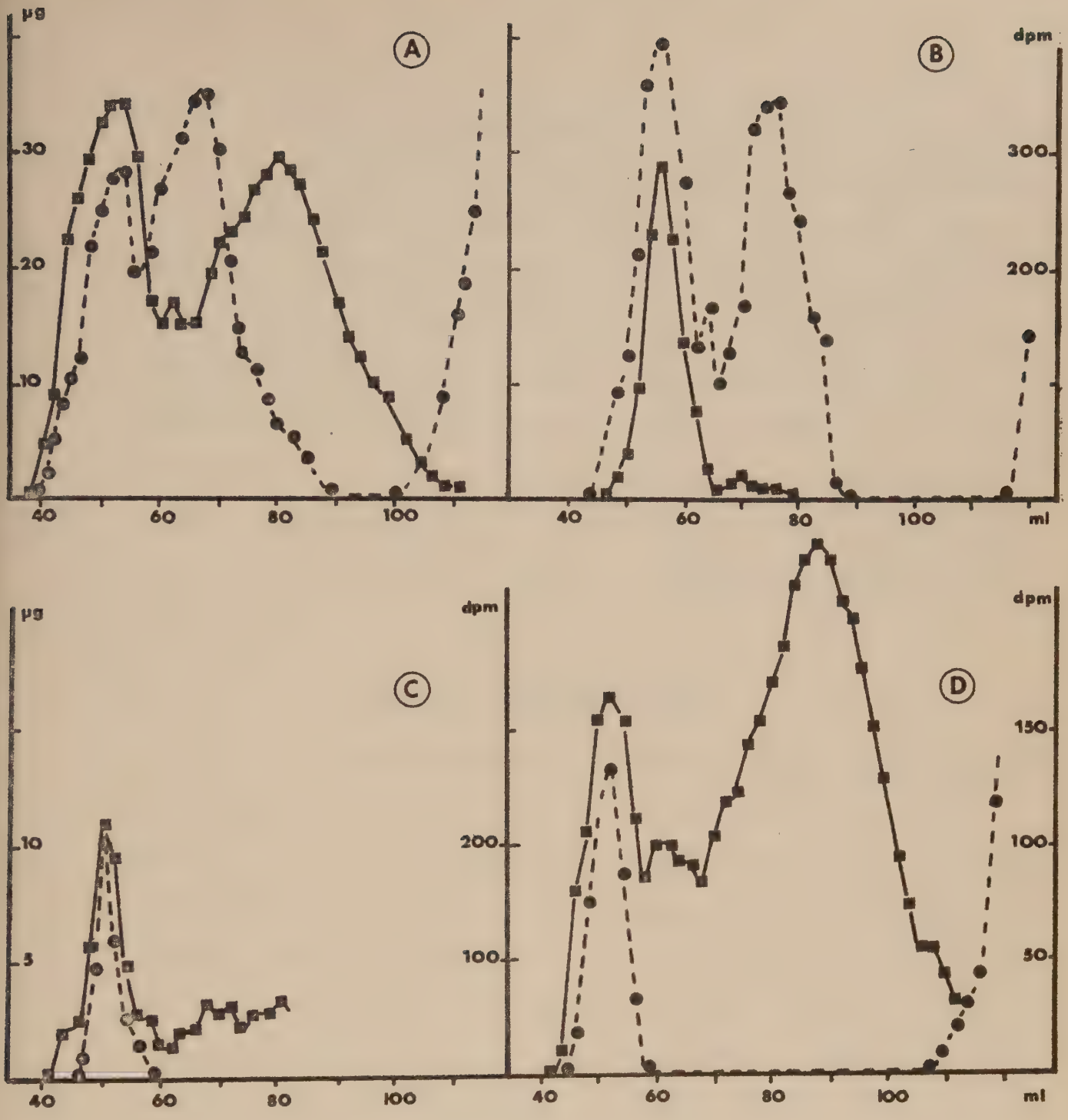


Fig. 34 - Chromatographies sur gels de Sephadex G 200 de noyaux purifiés extraits par NaCl M (A-B) ou extraits par le tampon phosphate 0,05 M (C) puis le NaCl M (D).

- En ordonnées : A gauche, taux de protéines (A, C, D) ou de DNA (B) en µg par ml d'éluat.
- En abscisses : A droite, dpm par ml d'éluat
  Fractions éluées en ml
- En trait plein : élution de protéines (A-C-D), de DNA (B)
- En pointillé : élution de la radioactivité.

L'analyse chromatographique sur gel de Sephadex G 200 de l'extrait NaCl M, obtenu par traitement du culot de noyaux préalablement extraits avec la solution tampon phosphate, nous permet de séparer deux fractions protéiques principales. La première renferme des protéines, histones et non histones et le DNA qui leur est associé. La seconde, de K_{av} 0,41, correspond aux protéines dissociées par la force ionique élevée du NaCl utilisé : vraisemblablement des histones. Une petite fraction protéique, de K_{av} 0,20-0,21, est éluée entre ces deux zones (Figure 34 D). Quant à la radioactivité, elle est éluée en deux pics : le premier est associé aux protéines et au DNA exclus du gel, le second correspond au passage de l'hormone libre (Figure 34 D).

b) Extraction directe par NaCl M

Après chromatographie sur colonne de gel de Sephadex G 200 de l'extrait préparé par traitement direct des noyaux purifiés par le NaCl M, le profil d'élution des protéines est identique à celui obtenu précédemment après extraction par la solution de NaCl M. Les protéines sont séparées en deux pics principaux : l'un exclu du gel en même temps que le DNA, l'autre de K_{av} 0,41 (Figure 34 A). Par contre, l'élution de la radioactivité est différente. En dehors de la radioactivité libre, deux autres fractions peuvent être identifiées ; la première est éluée avec le premier pic de protéines (Figure 34 A) et le DNA (Figure 34 B), la seconde avant le second pic protéique et possède un K_{av} de 0,25-0,27 (Figure 34 A-B). Le poids moléculaire de cette fraction peut être évalué à 100-105.000 (Chapitre 3, Figure 20). Les essais d'extraction de la radioactivité nucléaire par une solution NaCl 2M, permettant une dissociation totale de la chromatine, ont été effectués et les extraits chromatographiés sur Sephadex G 200. Les protéines sont éluées après le volume d'exclusion. Aucune radioactivité n'est éluée avant la fraction libre.

5 - Etude de la nature des androgènes des noyaux d'hypophyse de rats normaux ou castrés

La nature des androgènes nucléaires de l'hypophyse a été étudiée *in vitro* par incubation de tissu hypophysaire ou de noyaux purifiés, en présence de testostérone-^{3}H et *in vivo* après injection de cette hormone à des rats normaux ou castrés.

a) Nature des androgènes liés et libres présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux après 30 minutes d'incubation des hypophyses, à 37°C, en présence de testostérone-^{3}H

α) Analyse chromatographique des stéroïdes nucléaires après extraction directe de la radioactivité des noyaux

L'analyse chromatographique des stéroïdes a été effectuée, dans un premier temps, après extraction directe de la radioactivité des noyaux par broyage dans le mélange $CHCl_3$-méthanol (2/1). Les résultats montrent que les principaux androgènes présents sont la testostérone qui constitue 80 % de la radioactivité totale du chromatogramme et la DHT qui représente 7,4 %. De faibles quantités d'androstanediols (4,3 %) et d'androstènedione (3 %) sont détectées sur les chromatogrammes. A l'origine et au front du chromatogramme, des traces de composés polaires et apolaires sont présentes(Tableau XXXIX).

β) Analyse chromatographique des stéroïdes liés et libres des sous-fractions nucléaires

L'étude chromatographique des stéroïdes liés aux macromolécules nucléaires et libres (après filtration sur Sephadex G 25) a été

réalisée dans les extraits,obtenus par traitement des noyaux par la solution tampon phosphate, puis par la solution de NaCl M et également dans l'extrait nucléaire provenant d'un traitement direct des noyaux par le NaCl M. Dans ce dernier cas, le culot restant a été extrait par du chloroforme-méthanol (2/1) et analysé ensuite.

Dans la fraction liée de l'extrait tampon phosphate, la testostérone constitue le principal stéroïde du chromatogramme (63 %). Les autres zones radioactives correspondent aux composés apolaires migrant en front (15 %), aux androstanediols (7 %) aux stéroïdes polaires (4 %) situés à l'origine du chromatogramme. De très faibles quantités de DHT (2 %) et d'androstènedione sont mesurés (Tableau XXXIX). Dans la fraction libre de cet extrait tampon phosphate, les mêmes stéroïdes sont identifiés. La testostérone représente 76 % de la radioactivité totale. Quant aux autres stéroïdes, ils sont présents en quantité plus faible : DHT (8 %), androstènedione (2 %), composés apolaires (4 %), diols (2 %) et stéroïdes polaires (3,4 %) (Tableau XXXIX).

La testostérone constitue également la principale zone radioactive du chromatogramme effectué avec la fraction liée de l'extrait NaCl M préparé après traitement des noyaux par la solution tampon phosphate. La DHT constitue 8,5 %, les composés polaires 6,8 % et la zone apolaire 7,9 %. L'analyse de la fraction libre est peu différente (Tableau XXXIX).

Les mêmes stéroïdes sont retrouvés après migration des fractions liées et libres de l'extrait nucléaire obtenu par traitement par la solution de NaCl M. La répartition est identique à celle de l'extrait NaCl M préparé après traitement préalable par la solution tampon phosphate. Il semble que les androstanediols soient cependant extraits plus facilement par le tampon phosphate (Tableau XXXIX). Quant au culot restant après traitement par la solution de NaCl M, il renferme un taux élevé de testostérone, également

TABLEAU XXXIX

Nature des androgènes présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux, après 30 minutes d'incubation du tissu en présence de testostérone-^{3}H.

Résultas exprimés en % par rapport à la radioactivité totale du chromatogramme

Extractions du culot de noyaux

	directe	Tampon phosphate + NaCl M			
	($CHCl_3/CH_3$-OH)	F. liée	F. libre	F. liée	F. libre
Stéroïdes polaires	1,3	4,1	3,4	6,8	1,5
Diols	4,3	7	2	1,5	N.D
Testostérone	80	63	76	70	79
DHT	7,4	2	8	8,5	8
Androstènedione	3	2	2	N.D	2
Androstanedione et composés apolaires	1,5	15	4	7,9	4,5

NaCl M

	Fraction liée	Fraction libre	Culot final
Stéroïdes polaires	6	5,1	7
Diols	6	N.D	4
Testostérone	66	80	37
DHT	7	5	8
Androstènedione	2	2,8	13
Androstanedione et composés apolaires	7	N.D	21

d'androstènedione et de composés très apolaires (androstanedione et éventuellement le composé apolaire présent dans le cytosol). (Tableau XXXIX).

b) Nature des androgènes présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux ou castrés incubés en présence de testostérone-^{3}H

Après 1 heure d'incubation, à 25°C, en présence d'un système générateur de NADPH et de $2,1.10^{-8}$ M de testostérone-^{3}H, les noyaux d'hypophyses de rats normaux renferment 88 % de testostérone et 5,8 % de dihydrotestostérone (moyenne de 7 expériences). Ceux des hypophyses de rats castrés, depuis 15 jours, contiennent 76 % de testostérone et 16,4 % de DHT. En dehors de ces deux stéroïdes, seules des traces d'androstènedione sont détectées sur le chromatogramme. Exprimée en pmoles de DHT formée par mg de protéines nucléaires et par heure, l'activité de la 5 α-réductase est de 0,74 dans les noyaux d'hypophyses de rats normaux et de 1,80 dans ceux d'hypophyses de rats castrés, ce qui traduit une augmentation de 143 % du taux de la DHT chez le rat castré.

Il faut ajouter qu'une telle augmentation de l'activité de la 5 α-réductase n'est pas observée après incubation de noyaux d'hypothalamus de rats normaux ou castrés.

L'identification de la DHT a pu être réalisée : Après séparation dans le système de KOCHAKIAN et STIDWORTHY (141), la DHT éluée est chromatographiée dans le système de solvants : isooctane-méthanol-eau (150-135-15). Dans ce système; 88 % de la radioactivité présentent le même Rf que la DHT témoin. Après acétylation d'une fraction de la DHT purifiée et chromatographie dans le système de solvant : isooctane-phénylcellosolve (à saturation) de l'acétate de DHT formée, 93 % du composé acétylé migrent en une tache bien localisée correspondant au témoin. Les résultats de la cristal-

lisation, alors entreprise, confirment la pureté de la DHT et son identité (Tableau C.).

TABLEAU C.

Cristallisation de la DHT

Résultats exprimés en dpm par mg de DHT (A_S)

	Solvant	A_S départ	A_S cristaux	A_S eaux-mères
		842		
Ière C	méthanol		831	847
IIème C	benzène 3 isooctane 1		866	833

c) *Nature des androgènes présents dans les noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats normaux et castrés, une heure après l'injection intra-péritonéale de testostérone-^3H*

Cette étude n'a pu être effectuée qu'après avoir groupé les extraits provenant de 2 expériences avant d'effectuer la séparation par chromatographie. Elle est réalisée à partir de l'extrait nucléaire obtenu par traitement par la solution de NaCl M. Après chromatographie dans le système de solvants de KOCHAKIAN et coll. (141), les noyaux purifiés d'hypophyses de rats normaux ou castrés (depuis 10 jours) ne renferment que deux stéroïdes : la testostérone et la DHT (Figure 35). Les noyaux purifiés préparés à partir d'hypophyses de rats normaux renferment 63 % de testostérone et 21 % de DHT, les noyaux provenant d'hypophyses de rats castrés contiennent 54 % de testostérone et 35 % de DHT à l'exclusion de tout autre stéroïde. Si l'on exprime les résultats en effectuant le rapport $\frac{DHT}{T}$, il est égal à 0,34 pour les

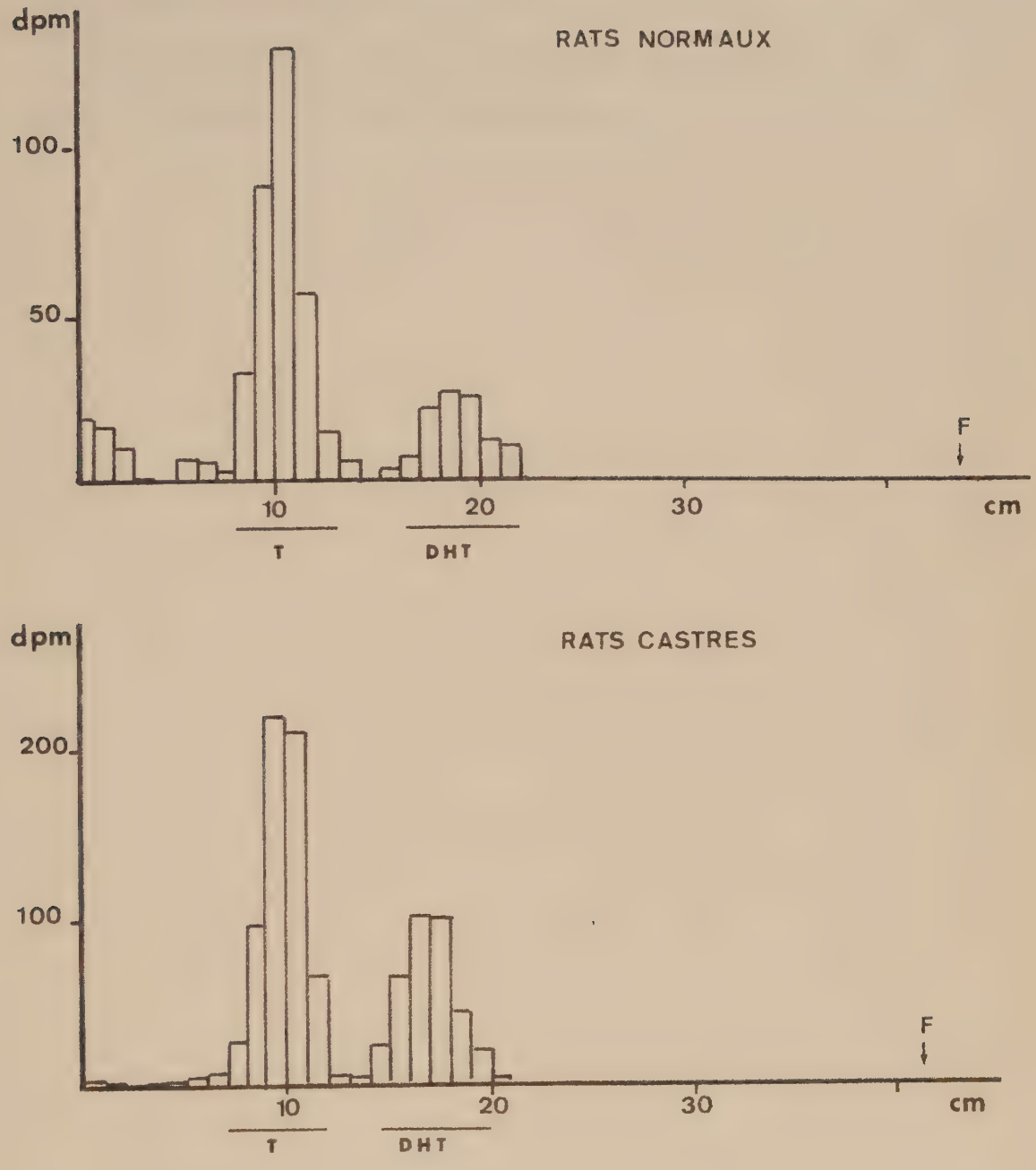


Fig. 35 - Chromatographie sur papier des stéroïdes extraits par NaCl M, des noyaux d'hypophyse de rats normaux et castrés, 1 heure après l'injection I.P. de testostérone-^{3}H

- En ordonnées : Radioactivité en dpm par cm
- En abscisses : Migration des stéroïdes en cm

La position des stéroïdes témoins sur le chromatogramme est indiquée par un trait plein sous l'axe des abscisses. T = testostérone, DHT = dihydrotestostérone.

noyaux hypophysaires de rats normaux et à 0,65 pour ceux de rats castrés. Il y a donc une augmentation importante de la quantité de DHT dans les noyaux d'hypophyses de rats après castration.

III - DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS

L'étude des macromolécules, liant les androgènes dans les noyaux de l'hypophyse antérieure, a été réalisée *in vitro*, après incubation de coupes de tissu, ou *in vivo*, et préparation de noyaux purifiés. Il nous a semblé indispensable d'utiliser pour cette étude des préparations nucléaires exemptes de contaminants cytoplasmiques. La méthode de purification basée sur celle de WIDNELL et TATA (192), modifiée par DUTTON et MAHLER (193),a été adaptée au tissu hypophysaire, en tenant compte des remarques faites par différents auteurs. WIDNELL et TATA ont signalé que la température doit rester comprise, pendant toute la préparation des noyaux, entre 0° et 4°C. A des températures plus basses, une variation de la viscosité conduit à une perte importante de noyaux (192). Ces auteurs ont également montré l'influence de la concentration en ions Mg^{++} des solutions de saccharose. Bien que l'aspect morphologique de la fraction nucléaire brute soit meilleur avec une concentration de 3 mM de $MgCl_2$ dans le milieu d'homogénéisation, cette concentration dans le sucrose de purification entraîne une contamination du culot de noyaux tandis que 0,4 mM de $MgCl_2$ provoque l'agglutination des noyaux. Une concentration en Mg^{++} de 1 mM ne produit ni contamination ni agglutination. D'autres auteurs ont souligné l'influence du pH des solutions d'homgénéisation et de purification sur l'intégrité des noyaux. LØWTRUP-REIN et coll. indiquent que les noyaux les plus purs et les mieux séparés sont obtenus avec des solutions de pH 6,5 (200). SPORN et coll. ont remarqué une augmentation de la tendance des membranes nucléaires à se rompre pour des valeurs de pH supérieures à 6,8 (201). L'homogénéisation du tissu avec 20 aller et retour du

piston le plus large du broyeur de Dounce dans une solution de sucrose 0,32 M contenant 3 mM de $MgCl_2$ (pH 6,5), donne un broyage suffisant des hypophyses. Une centrifugation de cet homogénat (dont la concentration en sucrose a été réduite à 0,25 M) sur une couche de sucrose d'homogénéisation, pendant 6 minutes à 600 x g, sédimente la majeure partie des noyaux qui conservent leur intégrité morphologique. Le broyage direct du tissu dans une solution de sucrose 0,32 M plutôt que 0,25 M produit moins de dommages aux noyaux (192). Nous avons constaté, comme LAWSON et coll., que la reprise du culot 600 x g de noyaux bruts par le sucrose d'homogénéisation et l'addition progressive du sucrose de purification, évitant un changement brutal de molarité, améliore l'aspect de la fraction nucléaire (194). Quant au choix du rotor utilisé pour la centrifugation de purification, nous avons initialement utilisé un rotor 40, présentant un angle supérieur à 25°, comme l'indiquait la technique initiale (192). Des essais de centrifugation avec un rotor SW 50 nous ont donné une meilleure sédimentation des noyaux et une bonne séparation des débris cellulaires de densité plus faible. La durée de la centrifugation est de 75 minutes, l'allongement de la période de centrifugation ne produisant pas une récupération supérieure de noyaux. Il faut ajouter que la préparation doit être effectuée le plus rapidement possible, toute attente supplémentaire entraînant une dégradation rapide des noyaux. Cette technique permet d'obtenir un culot de noyaux purifiés translucide, exempt de contaminants sanguins. L'examen en microscopie optique montre l'absence de cellules entières et de contaminants cytoplasmiques visibles. Un examen en microscopie électronique confirme ces résultats : absence de mitochondries et conservation de l'intégrité morphologique des noyaux. Les tests biochimiques permettent également de conclure à une pureté suffisante de la préparation. Le rapport $\frac{RNA}{DNA}$, égal à 1,5 dans l'homogénat hypophysaire initial est, en moyenne de 0,18

dans la préparation purifiée. Ces résultats sont comparables aux valeurs publiées par BALAZ et coll. (202). Le rapport $\frac{RNA}{DNA}$ dans l'homogénat de cerveau a une valeur de 2,11 et est abaissé à 0,24 dans les noyaux purifiés. Les dosages de DNA réalisés dans l'homogénat hypophysaire et dans la fraction nucléaire purifiée permettent de calculer un pourcentage de récupération compris entre 36 et 37 %.

L'extraction de la radioactivité et des protéines a été effectuée selon deux méthodes. Dans le premier cas, un éclatement des noyaux par broyage dans une solution tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4, permet d'extraire 10 % des protéines et 65 % de la radioactivité totale nucléaire. Cet extrait tampon phosphate renferme les protéines nucléaires solubles et éventuellement des contaminants cytoplasmiques, mais pas de DNA. Le culot, restant après traitement par la solution tampon phosphate,est agité avec une solution de NaCl M,i.e de force ionique élevée. Ce traitement permet d'extraire 42,5 % de protéines et 17 % de la radioactivité. Le culot résiduel contient encore 47 % des protéines et 15 % de la radioactivité. Différents auteurs ont montré que le traitement de la chromatine par une solution saline de force ionique élevée $\mu = 1$, permet de dissocier la chromatine en histones libres, protéines non-histones libres et DNA encore complexé avec des protéines non-histones et certaines fractions d'histones (199). La dissociation n'est complète que pour une force ionique $\mu = 2$, mais le but de ce traitement qui est d'extraire le maximum de la radioactivité nucléaire est atteint avec le NaCl M. Il faut noter l'importance du pH. Nous avons utilisé du NaCl M en solution aqueuse de pH 5,6. A pH 6, peu de protéines non-histones sont extraites. Leur solubilisation nécessite un pH 7,5-8 (203). Cette solubilisation de la chromatine peut être obtenue directement par agitation du culot de noyaux avec une solution de NaCl M. L'extrait nucléaire, très visqueux, contient 93 % du DNA, 57 à 60 % des protéines et 80 % de la radioactivité nucléaire. Cette méthode a été utilisée par MAINWARING (76) et par

UNJHEM (173) pour extraire les récepteurs nucléaires de la prostate. Après extraction par le NaCl 0,6 M, BRUCHOWSKY et WILSON montrent que 85 % des protéines, 50 % du DNA et 85 % à 90 % de la radioactivité des noyaux de prostate sont solubilisés (72). Cette méthode a été utilisée également pour l'isolement des récepteurs nucléaires de l'oestradiol (46, 204).

L'étude de la pénétration, *in vitro*, de la testostérone-^{3}H dans les noyaux en fonction du temps d'incubation du tissu indique une fixation rapide de l'hormone. Après 30 à 60 minutes d'incubation, il semble qu'un équilibre soit atteint, la radioactivité nucléaire totale restant constante pendant la période étudiée ensuite. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par UNJHEM (173) : cet auteur note une fixation maximale de la testostérone-^{3}H par les noyaux de prostate après une incubation du tissu pendant 30 minutes. La radioactivité extraite par la solution NaCl M varie parallèlement à la radioactivité totale des noyaux. Des associations macromoléculaires des androgènes peuvent êtremises enévidence dans cet extrait. L'activité spécifique de ces complexes est également constante après 30 à 60 minutes d'incubation des hypophyses. La radioactivité associée aux macromolécules nucléaires ne constitue que 9 % de la radioactivité totale de l'extrait NaCl. Les androgènes sont également liés aux macromolécules solubles de l'extrait tampon phosphate. La radioactivité liée ne représente que 1,8 % de la radioactivité extraite dans cette fraction, alors que l'extrait NaCl M préparé ensuite contient 18 % d'androgènes associés aux macromolécules exclues sur Sephadex G 25. Ces résultats montrent qu'après incubation d'hypophyses en présence de testostérone-^{3}H, la fraction nucléaire renferme une grande quantité de radioactivité libre. Il en est de même pour les noyaux de prostate ventrale après incubation du tissu *in vitro* (72, 76, 173). Il est possible que le stéroïde radioactif libre pénètre dans les noyaux (dont il est facilement extrait par broyage dans le tampon phosphate) par

un simple phénomène de diffusion passive.

Les résultats sont différents après injection intra-péritonéale de testostérone-^{3}H à des rats normaux. La fixation de la radioactivité par les noyaux d'hypophyse antérieure atteint un maximum 60 minutes après l'administration de l'hormone, alors que décroît la radioactivité du cytoplasme. Cette observation pose le problème du transport de la radioactivité cytoplasmique au noyau. Ces résultats concordent avec les observations décrites par SAR et STUMPF (139). Ces auteurs constatent une concentration de la radioactivité dans les noyaux des cellules gonadotropes d'hypophyses de rats, une heure après l'injection de testostérone-^{3}H. Il semble, d'après les résultats de MAINWARING, que la concentration de la radioactivité par les noyaux de prostate soit maximale 30 minutes après l'injection de testostérone-^{3}H (168). Après filtration sur colonne de gel de Sephadex G 25 de l'extrait NaCl M, l'hormone libre ne représente, *in vivo*, qu'une faible partie de la radioactivité totale. En effet, 67 % des androgènes sont associés à des macromolécules nucléaires. Compte tenu du temps nécessaire à la préparation des noyaux et à leur extraction, et de la dissociation due à la filtration sur gel de Sephadex, on peut penser, qu'*in vivo*, la majeure partie ou peut-être même la totalité des androgènes nucléaires est associée à des macromolécules. Dans une revue générale sur les récepteurs des stéroïdes intra-cellulaires, L. KORNEL indique que les noyaux des cellules des tissus cibles pour les hormones stéroïdes ont des sites de liaison spécifiques qui peuvent retenir un complexe spécifique "hormone-récepteur cytoplasmique" mais pas le stéroïde libre seul (205). De plus, il semble que les androgènes soient principalement fixés à la chromatine puisque l'extrait NaCl M renferme, *in vivo*, la majeure partie de la radioactivité.

Après chromatographie sur colonne de Sephadex G 200, l'extrait tampon phosphate contient une fraction protéique principale à laquelle est associé un pic radioactif. Cette fraction est éluée dans le volume exclu

de la colonne. Elle correspond aux protéines nucléaires solubles. Par gel filtration sur Sephadex G 200 de l'extrait NaCl M préparé ensuite, deux fractions protéiques principales sont séparées. La première exclue du gel correspond aux protéines histones et non histones associées au DNA, la seconde correspond aux protéines histones et non-histones libres dissociées de la chromatine. La radioactivité est séparée en deux parties : la première est éluée avec les protéines exclues et le DNA, la seconde avec l'hormone libre. Le fractionnement sur Sephadex G 200 de l'extrait nucléaire provenant du traitement direct des noyaux par le NaCl M présente le même profil d'élution protéique : 1 pic exclu coïncidant avec l'élution du DNA et 1 pic de K_{av} = 0,41. Quant à la radioactivité éluée avec les protéines, elle est séparée en deux fractions : la première exclue du gel avec le DNA, la seconde présente un K_{av} de 0,25-0,27, ce qui permet de calculer un poids moléculaire apparent de 100 à 105.000. L'existence de ces deux types d'association des androgènes dans les noyaux hypophysaires n'est pas surprenante. BRUCHOWSKY et WILSON ont également identifié deux fractions radioactives dans l'extrait NaCl 0,6 M des noyaux de prostate, fractionnés sur Sephadex G 200 : l'une est exclue du gel, l'autre légèrement retenue (72). De même, O'MALLEY et coll. ont, par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose, dissocié le récepteur de la progestèrone en deux fractions (206). GIANNOPOULOS et GORSKI ont séparé deux formes de récepteurs nucléaires de l'oestradiol dans l'utérus par chromatographie sur gel de Sephadex G 200 (207). Ces résultats tendent à prouver que dans les noyaux, il peut éxister plusieurs types d'associations macromoléculaires ou une même association sous différentes formes. Après éclatement des noyaux et extraction des protéines solubles par le tampon phosphate, l'extrait NaCl M ne renferme qu'un type d'associations macromoléculaires. La nature de ces différents types d'associations et la formation éventuelle d'un complexe avec le DNA restent à définir.

L'étude de la nature des androgènes montre que les noyaux purifiés d'hypophyse antérieure renferment presqu'exclusivement de la testostérone et de la dihydrotestostérone. Après incubation d'hypophyses en présence de testostérone-^{3}H et extraction directe de la radioactivité nucléaire, l'analyse chromatographique montre que la testostérone constitue 80 % de la radioactivité, la DHT 7,4 %. Des traces de stéroïdes polaires, d'androstanediols , d'androstènedione et de composés apolaires sont également présentes. Sur les chromatogrammes des stéroïdes liés des sous-fractions nucléaires, les mêmes stéroïdes peuvent être identifiés. La testostérone est le principal composé, les androstanediols semblent surtout présents dans l'extrait tampon phosphate, la DHT dans les extraits NaCl. On observe peu de différences après chromatographie des fractions libres de ces extraits. Dans des travaux très récents, BERTRAND et coll. ont étudié les stéroïdes liés de l'extrait nucléaire, solubilisé par NaCl M, de l'hypophyse de rats adultes. Les tissus sont incubés avec de la testostérone-^{3}H pendant deux heures. La DHT constitue 18 % de la radioactivité liée aux protéines, la testostérone 25 à 35 % ; 50 % de la radioactivité représentent des métabolites dont l'identité n'est pas définie (208).

Après incubation de noyaux purifiés d'hypophyses antérieures de rats mâles normaux et castrés, en présence d'un système générateur de NADPH et de testostérone-^{3}H, on constate que ces noyaux sont capables de transformer une partie de la testostérone en dihydrotestostérone. De plus, après 15 jours de castration, le taux de dihydrotestostérone formé est très nettement accru dans les noyaux purifiés. L'activité spécifique de la 5 α-réductase, exprimé en pmoles de DHT formée par mg de protéines nucléaires et par heure, est de 1,80 dans les noyaux purifiés d'hypophyses de rats castrés depuis 15 jours, de 0,74 dans les noyaux d'hypophyses de rats normaux.

Le métabolisme de la testostérone-^{3}H,observé dans les expériences

in vivo, confirment les résultats précédents. Une heure après l'injection de testostérone, les seuls androgènes identifiés dans les noyaux sont la testostérone et la DHT. Le taux de DHT est plus élevé *in vivo* qu'*in vitro* et est augmenté de manière importante lorsque la testostérone est injectée à des rats castrés. Le rapport $\frac{DHT}{T}$ est de 0,34 pour les noyaux d'hypophyse de rats normaux et de 0,65 pour ceux de rats castrés. Ces rapports sont nettement plus élevés que ceux des fractions liées du cytoplasme qui sont respectivement de 0,13 pour les rats normaux et de 0,48 pour les rats castrés. D'après ces résultats, il semble qu'il y ait une concentration de la DHT dans les noyaux d'hypophyse de rats normaux et castrés par rapport au cytoplasme. Cette constatation a été également faite par BERTRAND et coll. (208). Ces auteurs notent une quantité plus élevée de DHT liée aux protéines nucléaires qu'aux protéines cytosoliques après incubation d'hypophyses avec de la testostérone-^{3}H (208).

Cette fixation nucléaire de la DHT pose le problème de la localisation de la 5 α-réductase. Les résultats obtenus après injection de l'hormone ou après incubation de tissu ne permettent pas de préciser l'origine de la DHT nucléaire. Celle-ci peut être synthétisée dans les microsomes et transportée au noyau ou être produite par une 5 α-réductase nucléaire. L'incubation de noyaux purifiés en présence de testostérone semble indiquer que la DHT formée résulte de l'action d'une 5 α-réductase nucléaire mais les noyaux purifiés incubés possèdent encore leur double membrane. Il est généralement admis que, dans certains organes tels la prostate et le rein, la 5 α-réductase est présente à la fois dans les microsomes et dans

les noyaux (68, 191, 209). FREDERIKSEN et WILSON (191), puis MOORE et WILSON (209) ont démontré que, dans la prostate, la 5 α-réductase nucléaire est située dans la membrane nucléaire. Il faut noter que ROMMERTS et VAN DER MOLEN attribuent l'activité de la 5 α-réductase nucléaire de l'hypophyse à une contamination par les microsomes (144). Des travaux complémentaires seront donc nécessaires pour certifier la présence de 5 α-réductase dans les noyaux d'hypophyse.

Nous avons préalablement montré que la castration engendre une augmentation de l'activité de la 5 α-réductase des microsomes. Après incubation de noyaux purifiés avec de la testostérone-^{3}H ou après injection de cette hormone, les taux de DHT des noyaux d'hypophyses de rats castrés sont nettement plus importants que ceux des hypophyses de rats normaux. Restent à déterminer les raisons de cette augmentation particulière à l'hypophyse. L'activité 5 α-réductase des noyaux purifiés d'hypothalamus de rats n'est pas modifiée par la castration. Comme l'ont noté VERHOEVEN et coll., nous avons observé qu'elle est supérieure à celle des noyaux d'hypophyse (210).

En résumé, des associations macromoléculaires des androgènes ont été mises en évidence, *in vitro* et *in vivo*, dans les noyaux purifiés de l'hypophyse antérieure du rat mâle. La radioactivité est associée aux macromolécules de la chromatine. Deux pics de radioactivité ont été séparés par chromatographie de la chromatine sur colonne de gel de Sephadex G 200. L'un pourrait représenter le récepteur nucléaire, associé à une protéine, l'autre éventuellement être fixé au DNA considéré comme accepteur. Actuellement, de nombreuses controverses demeurent quant à la nature chimique des sites accepteurs du récepteur. Des preuves expérimentales ont été apportées pour attribuer ce rôle d'accepteur aux différents constituants de la chromatine :

DNA (211, 212, 213), protéines basiques (214), protéines acides (206), et ribonucléoprotéines (215). Les études de SCHRADER et coll. suggèrent que le récepteur de la progestérone de l'oviducte de poule serait formé de deux constituants différents (216). Ces deux protéines présenteraient toutes deux une forte affinité pour la progestérone, mais l'une se fixerait sur le DNA et l'autre sur les protéines acides de la chromatine (216).

L'analyse des stéroïdes présents dans les noyaux purifiés, *in vivo* et *in vitro*, ont montré qu'ils étaient principalement constitués par de la testostérone et de la dihydrotestostérone. La présence de DHT dans le noyau, en quantité supérieure à celle du cytoplasme, pose le problème de l'origine de cette DHT : transfert du cytoplasme au noyau et accumulation dans celui-ci ou synthèse de la DHT par la 5 α-réductase présente dans les membranes nucléaires.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous nous sommes proposés au cours de nos recherches de mettre en évidence des structures du type "Récepteur " capables de recevoir la testostérone à son entrée dans la cellule. Cette recherche était basée sur l'hypothèse qu'une hormone, véhiculée par voie sanguine, exerce particulièrement son action sur certains tissus, dits "organes cibles'. La reconnaissance de l'hormone par la cellule cible implique l'existence de molécules réceptrices de cette hormone. Ce problème a été étudié par de nombreux auteurs au niveau d'organes cibles : utérus, prostate, oviducte (4, 47, 217). Le problème se posait pour nous de savoir si l'hypophyse antérieure, organe de régulation de l'hormonogénèse, possède de telles structures réceptrices pour la testostérone ou ses métabolites. Ces recherches devaient également nous permettre d'apporter quelques éclaircissements quant au mécanisme d'action de la testostérone dans l'hypophyse, éventuellement selon le modèle "two-step" (218), et de contribuer à une meilleure compréhension de son rôle dans la régulation du rétro-contrôle des gonadostimulines hypophysaires.

×

× ×

Dans cette perspective, nous avons, dans un premier temps, étudié la captation *in vivo* de la testostérone-^{3}H par l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus, le cortex cérébral du rat normal et castré. Après injection intra-péritonéale ou sous-cutanée, nous avons constaté une captation rapide de la testostérone par ces organes, suivie d'une décroissance progressive. La fixation est plus élevée pour l'hypophyse antérieure que pour l'hypothalamus, le cortex cérébral et le cervelet ; ces deux derniers organes ne

présentant aucune différence entre eux et captant les androgènes un peu plus faiblement que l'hypothalamus. Ces résultats sont confirmés par les études autoradiographiques de SAR et STUMPF (139). Ils sont également en accord avec ceux de WHALEN et LUTTGE qui,après injection de testostérone-^{3}H, observent une fixation très rapide des androgènes dans l'hypophyse, l'hypothalamus et le cortex cérébral, plus lente dans les organes cibles (123). Cette différence entre l'hypophyse et les tissus cibles est également observée après injection d'oestradiol-^{3}H à des rates (108). Il y a également une différence dans la rétention des androgènes entre les organes de régulation et les tissus cibles. C'est pour l'hypophyse antérieure que la rétention de l'hormone, par rapport au cerveau et au sérum, est la plus importante, particulièrement lorsque le rat a été gonadectomisé 15 ou 30 jours avant l'injection de testostérone-^{3}H. La castration ne modifie pas les modalités de pénétration des androgènes dans l'hypophyse, l'hypothalamus et le cortex cérébral mais produit une augmentation de la quantité d'androgènes fixés, probablement par suppression de la principale source endogène de testostérone. Cet accroissement de la captation, particulièrement significatif pour l'hypophyse antérieure, l'est également pour l'hypothalamus et le cortex cérébral. Plusieurs auteurs parviennent à des conclusions semblables (126, 127).

Des incubations de tissu, *in vitro*, plus faciles à réaliser, permettent de confirmer les résultats observés *in vivo* et montrent une fixation rapide et progressive des androgènes par les tissus étudiés. Après gonadectomie, la fixation par mg de tissu est plus élevée pour l'hypophyse que pour l'hypothalamus et le cortex cérébral, ces deux organes présentant un comportement très voisin. Elle est moindre lorsque la température du milieu d'incubation des tissus est abaissée de 37° à 0°C, particulièrement pour les organes de rats castrés. Ces résultats peuvent laisser supposer que la pénétration de l'hormone dans les tissus, *in vitro*, résulte d'un double mécanisme, un

transport actif faisant appel à des facteurs énergétiques et un transport passif dû à une simple diffusion de l'hormone à travers la membrane cellulaire. L'addition au milieu d'incubation de substances telles que le 2,4-dinitrophénol, l'ATP ou l'AMP-cyclique ne modifie pas la captation de la testostérone par l'hypophyse, l'hypothalamus et le cortex cérébral de façon sensible. KATO a montré également que la présence d'ATP dans le milieu d'incubation n'augmente pas la captation de l'oestradiol par l'hypothalamus (134). Ces résultats ne permettent pas d'établir une différence entre une pénétration active de l'hormone dans la cellule et un simple phénomène d'échange-diffusion.

Nous avons, dans un second temps, étudié la répartition intracellulaire des androgènes fixés par l'hypophyse antérieure et l'hypothalamus. *In vivo* et *in vitro*, la majeure partie de la radioactivité hypophysaire est soluble et localisée dans les surnageants 800 x g ou 105.000 x g. Par contre, la radioactivité hypothalamique est répartie à peu près également entre le surnageant 800 x g et le culot correspondant. Ces proportions ne sont pas modifiées après gonadectomie des animaux et sont observées pour d'autres hormones (127, 134, 143, 156). *In vivo*, la distribution de la radioactivité intra-cellulaire de l'hypophyse antérieure a été étudiée dans le surnageant 39.000 x g post-mitochondrial. Dans cette fraction, la radioactivité décroît parallèlement à la courbe de la captation totale par l'organe.

x

x x

Dans toutes les fractions solubles hypophysaires ou hypothalamiques nous avons trouvé, après filtration sur colonne de Sephadex G 25, des associations androgènes-macromolécules, *in vivo* et *in vitro*. Ces associations peuvent se former en l'absence d'éléments structuraux puisqu'elles sont

également obtenues par incubation de cytosols avec de la testostérone-^{3}H. La proportion d'hormone libre est élevée et représente, *in vivo*, 85 à 90 % de la radioactivité du cytosol. Après castration, il y a peu de modifications de l'activité spécifique du complexe par rapport à l'augmentation totale de la radioactivité captée.

Ces complexes androgènes-macromolécules hypophysaires se présentent sous des formes variables selon les conditions expérimentales. Après incubation de tissus avec de la testostérone-^{3}H ou injection de cette hormone, la fraction radioactive associée aux protéines du cytosol est éluée sur Sephadex G 100 ou G 200 après le sérum-albumine. Il est possible de calculer un poids moléculaire apparent de 40.000. Lorsque le complexe androgène-macromolécule est formé par incubation directe du cytosol en présence de testostérone-^{3}H à 25°C, il est élué dans le volume exclu des gels de Sephadex G 100 et G 200. Il est possible que,dans ce cas, il y ait formation d'agrégats. De nombreux auteurs ont montré la tendance des formes 8 S à former des agrégats (81, 167, 168). D'autre part, il semble que, *in vivo*, la forme 8 S soit instable (168). Ces résultats ont permis, d'autre part, de montrer la stabilité du complexe, isolé sur colonne de Sephadex G 25, et chromatographié ensuite sur colonne de Sephadex G 100. Des chromatographies sur colonne de Sephadex G 200 de cytosols d'hypophyses antérieures et de sérum de rats ayant reçu une injection I.P. de testostérone-^{3}H permettent d'exclure la possibilité d'une contamination sanguine importante de la liaison des androgènes dans le cytosol.

×

× ×

L'étude de la nature des androgènes liés aux macromolécules hypophysaires et hypothalamiques des surnageants 800 g après incubation de ces tissus en présence de testostérone-^{3}H a montré l'hétérogénéité de cette

fraction. La testostérone et un composé apolaire sont les principaux éléments mais les androstanediols, la DHT, l'androstènedione et l'androstanedione sont également présents. La testostérone peut donc être métabolisée dans l'hypophyse et dans les centres nerveux supérieurs mais moins intensément que dans la prostate, utilisée comme témoin dans nos expériences. Dans cet organe cible, la DHT est le principal métabolite ; le composé apolaire, d'identité inconnue, est également présent en proportions importantes. Il faut noter que la DHT est totalement absente dans le muscle, ce qui a été vérifié *in vivo* par d'autres auteurs (177, 178). Après incubation de cytosols hypophysaires avec de la testostérone-^{3}H, sans addition de cofacteurs, on n'observe pas de formation de DHT et d'androstanediols, seul le composé apolaire se forme en quantités importantes. *In vivo*, les principaux métabolites hypophysaires de la testostérone-^{3}H sont des stéroïdes polaires, les androstanediols, la DHT. Des composés de même Rf que l'androstérone et l'androstènedione peuvent être identifiés dans certains cas. L'étude des stéroïdes liés aux protéines hypophysaires de rats castrés montre, en fonction du temps, une diminution du taux de la testostérone et une augmentation de celui de la DHT. Le rapport $\frac{DHT}{T}$ varie de 0,095 à 0,48 entre 5 et 60 minutes après l'administration de l'hormone. Dans les fractions libres, il faut noter la présence d'une quantité importante d'androstènedione. Le métabolisme de la testostérone est moins intense lorsque celle-ci est injectée à des rats normaux : 60 minutes après l'injection, le rapport $\frac{DHT}{T}$ n'est que de 0,13. Il faut noter la présence d'un composé de Rf semblable à l'androstérone qui n'est pas présent dans les extraits préparés *in vitro*. Ce composé est également retrouvé dans les fractions libres, où l'androstènedione est en proportion élevée. Il semble que la DHT soit présente en quantités plus importantes dans les fractions liées que libres. Par incubation de microsomes d'hypophyses de rats normaux, une activité 5 α-réductase peut être démontrée.

Cette activité est augmentée de fàçon très significative après castration.

La question se pose de savoir si la testostérone est active par elle-même ou ses métabolites, ou si ces derniers sont une forme de dégradation. Dans l'hypophyse et l'hypothalamus, sièges du contrôle du feed-back des androgènes, le problème est particulièrement important et complexe. On sait qu'après castration, la LH plasmatique et hypophysaire augmentent, ce qui laisse supposer une régulation de sa sécrétion par les stéroïdes testiculaires, dont la testostérone représente une fraction importante. Cependant une injection de testostérone à des rats castrés ne peut diminuer le taux de LH plasmatique qu'à des doses supérieures à celles nécessaires pour maintenir le poids normal de la prostate (184). Différentes expériences tendent à montrer que la DHT et les diols sont plus efficaces pour abaisser le taux de la LH que la testostérone (185, 186). MARTINI a montré que la DHT, le 3 β-androstanediol et plus particulièrement le 3 α-androstanediol ont un effet inhibiteur sur la sécrétion des gonadotrophines supérieur à celui de la testostérone (187). Plusieurs auteurs concluent que les métabolites de la testostérone pourraient être les médiateurs de l'effet de feed-back de cette hormone (187, 188).

×

× ×

La testostérone et la DHT étant les principaux androgènes associés aux macromolécules hypophysaires, des expériences ont été entreprises pour déterminer la saturabilité et l'affinité de ces liaisons, critères nécessaires pour définir l'existence d'un récepteur. Pour ces deux hormones, il existe deux types de liaison dans le cytosol d'hypophyses de rats prépubères comme l'indiquent les résultats exprimés selon SCATCHARD (153) : l'un est un composant de haute affinité à nombre de sites limités, saturables pour de faibles

concentrations d'hormone ; l'autre est un composant aspécifique, non saturable aux concentrations utilisées. La constante d'association, définie à l'équilibre et à 0°C, est de $4,2.10^{8} M^{-1}$ pour la testostérone, le nombre de sites est de 8.10^{-11} M. La DHT, étudiée dans les mêmes conditions, a une constante d'association supérieure et un nombre de sites récepteurs plus limité que celui de son précurseur : $K_A = 1,54.10^{9} M^{-1}$, $n = 1,2.10^{-11}$ M. KATO et ONOUCHI ont donné des valeurs de constante un peu plus basse ($K_D = 2,4.10^{-9}$ M) après analyse sur gradient de saccharose du récepteur hypophysaire de la DHT (158, 160). Les résultats concernant la testostérone sont proches des valeurs de la constante de dissociation du cytosol du rein de souris (189). Pour les deux hormones étudiées dans l'hypophyse, les résultats sont du même ordre que ceux connus pour les récepteurs hromonaux des organes cibles (190).

Les études de compétition, effectuées à l'équilibre et à 0°C, avec une concentration en testostérone-^{3}H ou en DHT-^{3}H, proche de celle saturant les sites spécifiques, et en stéroïdes compétiteurs froids à un taux 100 fois plus élevé permettent de montrer une spécificité importante des récepteurs cytosoliques de la testostérone et de la DHT dans l'hypophyse antérieure. Dans les conditions utilisées, seule la testostérone est très fortement compétitive sur le récepteur de la DHT. D'autres stéroïdes, progestérone, oestradiol 17-β, 3-α et 3-β androstanediols sont compétiteurs mais à un taux moindre tandis que l'androstènedione, l'oestradiol 17-α et la corticostérone n'ont aucune action inhibitrice sur la liaison. Si la compétition est effectuée sur le récepteur de la testostérone, la DHT et le 3-β androstanediol sont fortement compétitifs, la progestérone et le 17-β oestradiol plus faiblement. Par contre, le 3-α androstanediol, le 17-α oestradiol, l'androstènedione et la corticostérone n'ont pas d'effet sur la liaison. Ces résultats sont en accord avec les études de compétition effectuées dans le

cytosol de prostate (190) et dans le cytosol d'hypophyse (158).

L'ensemble de ces résultats tend à montrer que l'interaction entre la testostérone et la macromolécule réceptrice est spécifique et caractérise en même temps le récepteur. BAULIEU et coll. ont défini les critères de spécificité d'un "Récepteur". Ces critères incluent une spécificité du tissu, une spécificité de l'hormone, une liaison saturable présentant une affinité élevée (162). D'après nos résultats, la fixation des androgènes et leur rétention par l'hypophyse antérieure indiquent une certaine spécificité du tissu. Ces résultats ne sont pas aussi nets que pour certains organes cibles car il est possible, sinon vraisemblable, que seules les cellules gonadotropes de l'hypophyse puissent être considérées comme des cellules cibles vis-à-vis des androgènes à l'exclusion des autres types de cellules de cette glande (139). Deux types de liaison sont présents pour les androgènes dans l'hypophyse : l'une aspécifique, non saturable, l'autre spécifique, saturable à de très faibles concentrations hormonales. Ce composant spécifique présente un nombre de sites très limité. D'autre part, l'affinité de la liaison testostérone-macromolécule est élevée. Les études de compétition réalisées avec des stéroïdes androgéniques ou non ont montré une spécificité hormonale importante. Le fait que le principal métabolite de la testostérone, la dihydrotestostérone, possède également une liaison saturable spécifique, d'affinité élevée, pour les macromolécules du cytosol hypophysaire, pose le problème d'une pluralité éventuelle des récepteurs hypophysaires des androgènes et de leur rôle respectif. Très récemment, BLONDEAU et CORPECHOT ont démontré l'existence de deux protéines spécifiques liant la DHT dans le cytosol de prostate de rat et d'une protéine spécifique liant la testostérone (219).

x

x x

Les études préalables de la répartition intra-cellulaire des androgènes dans l'hypophyse, effectuées *in vivo* et *in vitro*, nous ont montré que la fraction sédimentée à 800 x g renferme 10 à 15 % de la radioactivité cellulaire. Ces observations semblent indiquer qu'une partie de la radioactivité est transférée au noyau. A ce stade de nos travaux, il nous a paru nécessaire d'étudier la captation des androgènes par les noyaux de l'hypophyse antérieure et leur association à des macromolécules nucléaires. Des contrôles effectués en microscopie optique, en microscopie électronique, des tests biochimiques ont permis de vérifier la pureté des préparations de noyaux et l'absence de contaminants cytoplasmiques.

Après incubation de coupes de tissus hypophysaires, à 37°C, en présence de testostérone-^{3}H et préparation de noyaux purifiés, deux méthodes ont été utilisées pour extraire les protéines et la radioactivité nucléaires : un éclatement de noyaux par broyage dans une solution tampon phosphate 0,05 M à pH 7,4, permet d'obtenir les protéines du suc nucléaire solubles, puis une extraction par une solution NaCl M permet de solubiliser la chromatine. L'extrait "tampon phosphate" renferme 10 % des protéines et 65 % de la radioactivité. L'extrait "NaCl M" contient 42,5 % des protéines et 17 % de la radioactivité. Dans la seconde méthode, la solubilisation de la chromatine est obtenue en traitant directement les noyaux par la solution NaCl M. Cet extrait contient 93 % du DNA, 57 à 60 % des protéines et 80 % de la radioactivité.

Les études de pénétration, *in vitro*, indiquent une fixation rapide de l'hormone dans les noyaux qui devient constante après 30 à 60 minutes d'incubation du tissu. La radioactivité de la chromatine, extraite par NaCl M,

varie parallèlement. Par chromatographie sur colonne de Sephadex G 25, on peut mettre en évidence dans cette fraction des associations macromoléculaires des androgènes qui représentent 9 % de la radioactivité totale de cet extrait. L'extrait "tampon phosphate" ne contient que peu de radioactivité associée aux protéines : 1,8 % de cet extrait. L'extrait NaCl M, obtenu ensuite renferme 18 % d'androgènes associés aux macromolécules de la chromatine. Les noyaux, après incubation de tissu *in vitro*, contiennent donc une proportion élevée d'hormones libres, peut-être par pénétration du stéroïde par diffusion. Il en est de même pour d'autres tissus, telle la prostate (72, 76, 173).

La fixation des androgènes par les noyaux d'hypophyse est un peu différente, *in vivo*. Elle est maximale 1 heure après l'injection alors que la radioactivité cytoplasmique décroît. Ces résultats montrent une fixation des androgènes par la chromatine nucléaire mais ne permettent pas d'élucider le problème de leur transfert. Les études histoautoradiographiques effectuées par SAR et STUMPF confirment ces résultats. Ces auteurs décrivent une concentration de la radioactivité par les noyaux des cellules gonadotropes, une heure après l'injection (139). L'hormone libre, *in vivo*, ne représente qu'une faible partie de la radioactivité nucléaire : 30 à 35 %. Une dissociation due aux manipulations ou à la filtration sur colonne de gel de Sephadex G 25 étant possible, la majeure partie ou peut-être même la totalité de la radioactivité nucléaire est associée aux macromolécules de la chromatine, *in vivo*. Il ressort d'observations nombreuses que les noyaux des cellules cibles pour les hormones stéroïdes ne retiennent pas d'hormone libre (205).

Nous avons ensuite étudié les associations macromoléculaires des sous-fractions nucléaires par chromatographies sur colonnes de gels de Sephadex G 200. Dans l'extrait "tampon phosphate", une fraction protéique, associée à la radioactivité, est éluée dans le volume exclu de la colonne.

L'extrait obtenu ensuite par traitement au NaCl M contient également une fraction radioactive associée au pic de protéines et au DNA, exclus du gel. Quand la solubilisation de la chromatine est effectuée directement par la solution NaCl M, le profil d'élution des protéines est le même que précédemment. Par contre, la radioactivité qui leur est associée, est éluée en deux zones : l'une avec le pic de protéines et le DNA exclus du gel, l'autre correspondrait à un poids moléculaire de 100 à 105.000. L'existence de deux fractions associées aux protéines et au DNA a été observée dans d'autres tissus (72, 204, 206, 207). La nature de ces associations, la liaison éventuelle avec le DNA restent à étudier.

L'étude de la nature des stéroïdes nucléaires montre qu'ils sont presqu'exclusivement constitués de testostérone et de DHT. *In vitro*, après incubation de coupes d'hypophyse antérieure, les noyaux purifiés renferment 80 % de testostérone, 7,4 % de DHT ; les autres composés, stéroïdes polaires, androstanediols, androstènedione, composés apolaires ne sont présents qu'à l'état de traces. Si l'on effectue une étude semblable sur les fractions liées de la chromatine, les mêmes stéroïdes peuvent être identifiés. Si des noyaux purifiés d'hypophyse sont mis à incuber dans un système contenant NADPH et testostérone-^{3}H, on constate qu'ils sont capables de transformer la testostérone en DHT. Après 15 jours de castration, le taux de DHT formé est augmenté de façon très significative, ce qui n'est pas observé pour l'hypothalamus. *In vivo*, la testostérone et la DHT sont les seuls stéroïdes présents dans la chromatine, extraite par NaCl M. Le taux de DHT, plus élevé qu'*in vitro*, est nettement augmenté lorsque l'injection de testostérone est faite à des animaux castrés. Le rapport $\frac{DHT}{T}$ est de 0,34 pour les noyaux d'hypophyses de rats normaux, de 0,65 pour ceux de rats castrés. Ces rapports sont beaucoup plus élevés que ceux du cytosol obtenus dans les mêmes conditions : 0,13 dans le cytosol de rats normaux, 0,48 dans celui de rats castrés (fractions

liées). Il semble qu'il y ait une concentration de la DHT dans les noyaux, ce qui a été indiqué également par BERTRAND et coll. après des études sur l'hypophyse, *in vitro*, (208).

Cette présence nucléaire de la DHT pose le problème de la localisation de la 5 α-réductase dans l'hypophyse : la DHT peut être produite par une 5 α-réductase nucléaire ou synthétisée par l'enzyme des microsomes, puis transportée au noyau. La formation de la DHT par les noyaux purifiés semble renforcer la première hypothèse mais les noyaux incubés possèdent leur double membrane. Dans la prostate, certains travaux ont localisés la 5 α-réductase dans la membrane nucléaire (191, 209). D'autres auteurs attribuent l'activité 5 α-réductase nucléaire de l'hypophyse à une contamination par les microsomes (144). Le problème n'est pas résolu actuellement.

x

x x

De nombreux problèmes restent à résoudre : transfert de l'hormone du cytoplasme au noyau, origine de la DHT nucléaire, modalité de la fixation du récepteur ou des androgènes sur les sites accepteurs de la chromatine, détermination de l'affinité et de la spécificité des liaisons nucléaires. L'étude des récepteurs est particulièrement complexe dans l'hypophyse antérieure qui pose un problème constant de matériel biologique et dont une partie seulement (10 à 15 %) est constituée par des cellules gonadotropes que l'on pourrait considérer comme des cellules cibles pour les androgènes (139). A cela, s'ajoute le problème du métabolisme de la testostérone et de son rôle dans l'hypophyse. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus ne décrivent que certaines séquences de l'action hormonale androgénique au niveau hypophysaire : fixation et rétention des androgènes par le tissu, liaison spécifique, d'affinité élevée, des androgènes, testostérone et DHT,

dans le cytosol, liaison de ces mêmes androgènes à la chromatine. Ces constatations ne permettent pas encore de définir un mécanisme d'action des androgènes dans l'hypophyse mais peuvent être rapprochées du schéma admis actuellement pour les hormones stéroïdes, dans les organes cibles.

De nombreux travaux ont montré une accumulation et une rétention des hormones stéroïdes dans leurs organes cibles. Dès leur entrée dans la cellule, ces hormones sont captées par des protéines cytoplasmiques spécifiques. Ces protéines intra-cellulaires ont été appelées "Récepteurs" à cause de leur présence exclusive dans les tissus cibles de chaque hormone, du fait de leur grande affinité de liaison et de leur spécificité étroite. Ces complexes présentent des coefficients de sédimentation variables, forment facilement des agrégats ; la forme native, *in vivo*, n'étant pas bien définie. Il a été démontré pour certains stéroïde que le complexe "hormone-récepteur" ainsi formé pénètre dans le noyau de la cellule où il se lie à la chromatine. En effet, certaines expériences, montrant que la présence du récepteur cytosolique est indispensable à la liaison nucléaire, ont conduit à l'hypothèse de "l'accepteur nucléaire". Dans ce cas, le récepteur activé ou non se fixe sur des sites accepteurs de la chromatine. La nature de ces sites n'est pas clairement définie : DNA, protéines acides ou basiques, [illegible]nucléoprotéines (213, 214, 215, 216). Dans d'autres systèmes, il a été montré que le récepteur cytoplasmique n'est pas indispensable à la formation de liaison nucléaire spécifique (220).

Au niveau nucléaire, le complexe dicterait au génôme le message hormonal dont le premier effet moléculaire serait la modification de la capacité de transcription de la chromatine. Récemment, des travaux ont montré un effet stimulant la synthèse de RNA dans des noyaux isolés par l'action du récepteur des androgènes de la prostate (221) ou du récepteur utérin de

l'oestradiol (222). Par contre pour le récepteur de la progestérone de l'oviducte de poule, particulièrement étudié, il n'a pas encore été possible de démontrer un effet de ce récepteur sur l'activité transcriptionnèlle de la chromatine (216, 223). L'argument définitif pour un rôle déterminant du récepteur dans le contrôle de la transcription serait la démonstration d'un effet du complexe sur la synthèse d'un RNA messager spécifique.

La mise en évidence de récepteurs spécifiques de la testostérone et de la DHT dans l'hypophyse antérieure du rat mâle semblerait indiquer que le mécanisme d'action de ces androgènes soit similaire à celui observé pour des organes cibles tels que la prostate. Il est possible que la présence de récepteurs spécifiques soit nécessaire au mécanisme d'action des androgènes et à leur intervention dans les phénomènes biochimiques du feed-back.

L'ensemble de ces résultats vient renforcer l'hypothèse d'une action directe des androgènes au niveau de l'hypophyse antérieure. Il semble admis, actuellement, que les androgènes ont une action directe au niveau de l'hypophyse antérieure (224, 225, 226). D'une manière générale, les androgènes diminuent la sensibilité de l'hypophyse vis-à-vis du LH-RH (185, 186, 226). Il y a donc un antagonisme LH-RH-androgènes au niveau de l'hypophyse. Il est donc important du point de vue de la physiologie de la reproduction de définir les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'intervention des androgènes dans l'hypophyse. Les recherches que nous avons entreprises ont été effectuées dans ce but. Elles ne réprésentent, évidemment, qu'une première étape dans l'étude de ces mécanismes de régulation dont la compréhension nécessitera encore de longues et patientes recherches.

B I B L I O G R A P H I E

1 - LEBLOND C.P., Ciba Foundation Conferences on isotopes in Biochemistry, Churchill ed., London, 1951, 4.

2 - TWOMBLY G.H., In "Vitamins and Hormones", ed. by R.S. Harris, I.G. Wool and J.A. Lorraine, Academic Press, New-York, 1951, 9, 237.

3 - GLASCOK R.F., HOEKSTRA W.G., Biochem. J., 1959, 72, 673.

4 - JENSEN E.V., JACOBSON H.I., Recent Progress Hormone Research, 1962, 18, 387.

5 - KING R.J.B., GORDON J., J. Endocrinol., 1966, 34, 431.

6 - ALBERGA A., BAULIEU E.E., C.R. Acad. Sci., 1965, D 261, 5226.

7 - ALBERGA A., BAULIEU E.E., Molec. Pharmacol., 1968, 4, 311.

8 - JENSEN E.V., Proceedings Canc. Research Confer., 1965, 6, 143.

9 - TALWAR G.P., SEGAL S.J., EVANS A., DAVIDSON D.W., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1964, 52, 1059.

10 - NOTEBOOM W.D., GORSKI J., Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111, 559.

11 - JENSEN E.V., De SOMBRE E.R., JUNGBLUT P.W., Hormonal Steroids, ed. L. Martini, F. Fraschini, M. Motta, Amsterdam, Excerpta Med., 1967, 492.

12 - JENSEN E.V., Proc. Int. Cong. Endocrin. 2nd, London, Amsterdam, Excerpta Med., 1964, 420.

13 - BAULIEU E.E., ALBERGA A., JUNG I., C.R. Acad. Sci., 1967, D 265, 454.

14 - STUMPF W.E., ROTH L.J., J. Histochem. Cytochem., 1966, 14, 274.

15 - JENSEN E.V., De SOMBRE E.R., HURST D.J., KAWASHIMA T., JUNGBLUT P.W., Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp., 1967, 56, Suppl. 3.4, 547.

16 - STUMPF W.E., Endocrinology, 1968, 83, 777.

17 - STUMPF W.E., Endocrinology, 1969, 85, 31.

18 - JENSEN E.V., De SOMBRE E.R., JUNGBLUT P.W., STUMPF W.E., ROTH L.J., Autoradiography of diffusible substances, ed. L.J. Roth, W.E. Stumpf, New-York, 1969, 81.

19 - KING R.J.B., GORDON J., COWAN D.M., and INMAN D.R., J. Endocrinol., 1966, 36, 139.

20 - TOFT D., GORSKI J., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1966, 55, 1574.

21 - ERDOS T., Biochem. Bioph. Res. Comm., 1968, 32, 338.

22 - ROCHEFORT H., BAULIEU E.E., C.R. Acad. Sci., 1968, D 267, 662.

23 - JENSEN E.V., SUZUKI T., NUMATA M., SMITHS S., De SOMBRE E.R., Steroids, 1969, 13, 417.

24 - JENSEN E.V., Develop. Biol. Suppl., 1969, 3, 151.

25 - ERDOS T., BEST-BELPOMME M., BESSADA R., Anal. Biochem., 1970, 37, 244.

26 - STEGGLES A.W., KING R.J.B., Biochem. J., 1970, 118, 695.

27 - LEE C., JACOBSON H.I., Endocrinology, 1971, 88, 596.

28 - TALWAR G.P., SAPORI M.L., BISWAS D.K., SEGAL S.J., Biochem. J., 1968, 107, 765.

29 - PUCA G.A., BRESCIANI F., Nature, 1969, 223, 745.

30 - KORENMAN S.G., Steroids, 1969, 13, 163.

31 - MESTER J., ROBERTSON D.M., FEHERTY P., KELLIE A.E., Biochem. J., 1970, 120, 831.

32 - ERDOS T., BESSADA R., FRIES J., Febs Lett., 1969, 5, 161.

33 - TRUONG H., BAULIEU E.E., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 237, 167.

34 - BAULIEU E.E., ALBERGA A., JUNG I., C.R. Acad. Sci., Paris, 1967, 265, 354.

35 - JENSEN E.V., SUZUKI T., KAWASHIMA, STUMPF W.E., JUNGBLUT P.W., De SOMBRE E.R., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1968, 59, 632.

36 - TENG C.S., HAMILTON T.H., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1968, 60, 1410.

37 - MAURER H.R., CHALKLEY G.R., J. Mol. Biol., 1967, 27, 431.

38 - JUNGBLUT P.W., HÄTZEL I., De SOMBRE E.R., JENSEN E.V., Colloq. Ges. Physiol. Chem., 1967, 18, 58.

39 - PUCA G.A., BRESCIANI F., Nature, 1968, 218, 967.

40 - KORENMAN S.G., RAO B.R., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1968, 61, 1028.

41 - SCHYAMALA G., GORSKI J., J. Biol. Chem., 1969, 244, 1097.

42 - GORSKI J., TOFT D., SCHYAMALA G., SMITH D., NOTIDES A., Rec. Prog. Horm. Res., 1968, 24, 45.

43 - ROCHEFORT H., BAULIEU E.E., Endocrynol., 1969, 84, 108.

44 - TOFT D., SCHYAMALA G., GORSKI J., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1967, 57, 1740.

45 - MUSLINER T.A., CHADER G.J., VILLEE C.A., Biochemistry, 1970, 9, 4448.

46 - ALBERGA A., MASSOL M., RAYNAUD J.P., BAULIEU E.E., Biochemistry, 1971, 10, 3835.

47 - BAULIEU E.E., ALBERGA A., JUNG I., LEBEAU M., MERCIER-BODARD C., ROCHEFORT H., TRUONG H., ROBEL P., MILGROM E., RAYNAUD J.P., RAYNAUD-JAMMET C., Recent Prog. Horm. Res., 1971, 27, 351.

48 - JENSEN E.V., NUMATA M., BRECHER P.I., De SOMBRE E.R., The Biochemistry of Steroid Hormone Action, Biochem. Soc. Sympos. 32, ed. R.M.S., Smellie, London, 1971, 133.

49 - De SOMBRE E.R., PUCA G.A., JENSEN E.V., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1969, 64, 148.

50 - PODRATZ K.C., KATZMAN P.A., Fed. Proc., 1968, 27, 497.

51 - FALK R.J., BARDIN C.W., Endocrinology, 1970, 86, 1059.

52 - WIEST W.G., RAO B.R., Advances in the Biosciences, ed. G. Raspé, Braunschweig, Germany : Pergamon-Vieweg, 1971, 251.

53 - O'MOLLEY B.W., SHERMAN M.R., TOFT D.O., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1970, 67, 501.

54 - O'MALLEY B.W., TOFT D.O., SHERMAN M.R., J. Biol. Chem., 1971, 246, 1117.

55 - SHERMAN M.R., CORVOL P.L., O'MALLEY B.W., J. Biol. Chem., 1970, 245, 6085.

56 - PUCA G.A., NOLA E., SICA V., BRESCIANI F., Advances in the Biosciences, ed. G. Raspé, Braunschweig, Germany, Pergamon-Vieweg, 1971, 213.

57 - MILGROM E., ATGER M., BAULIEU E.E., Steroids, 1970, 16, 741.

58 - Mc GUIRE J.L., De DELLA C., Endocrinology, 1971, 88, 1099.

59 - MILGROM E., BAULIEU E.E., Endocrinology, 1970, 87, 276.

60 - SPELSBERG T.C., STEGGLES A.W., O'MALLEY B.W., J. Biol. Chem., 1971, 246, 4188.

61 - PEARLMAN W.H., PEARLMAN M.R.J., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1321.

62 - TVETER K.J., Acta Path. Microb. Scand. Suppl., 1967, 187, 110.

63 - TVETER K.J., ATTRAMADAL A., Acta Endocrin. (Kbh), 1968, 59, 218.

64 - FANG S., ANDERSON K.M., LIAO S., J. Biol. Chem., 1969, 244, 6584.

65 - RITZEN E.M., SHIHADEH N.N., FRANK S.F., DOBBINS M.C., Endocrinology, 1971, 89, 143.

66 - STERN J.N., EISENFELD A.J., Endocrinology, 1971, 88, 1117.

67 - TVETER K.J., Endocrinology, 1969, 85, 597.

68 - BRUCHOWSKY N., WILSON J.D., J. Biol. Chem., 1968, 243, 2012.

69 - FARNWORTH W.E., BROWN J.R., Nat. Cancer Inst. Monograph., 1962, 12, 333.

70 - ANDERSON K.D., LIAO S., Nature, 1968, 219, 277.

71 - BAULIEU E.E., LASNITZKI I., ROBEL P., Nature, 1968, 219, 1155.

72 - BRUCHOWSKY N., WILSON J.D., J. Biol. Chem., 1968, 243, 5953.

73 - DORFMAN R.I., SHIPLEY R.A., Androgens, New-York, John Wiley and sons, Inc., 1956, 116.

74 - HUGGINS C., MAINZER K., J. Exp. Med., 1957, 105, 485.

75 - WILSON J.D., IInd Intern. Cong. on Hormonal Steroids, Milan, Int. Cong. Series n° 111, Excepta Med. Foundation, 1966, 45.

76 - MAINWARING W.I.P., Endocrinol. , 1969, 44, 323.

77 - UNJHEM O., TVETER K.J., AAKVAAG A., Acta Endoc., 1969, 62, 153.

78 - BELHAM J.E., NEAL G.E., WILLIAMS D.C., Biochem. J., 1969, 114, 32 P.

79 - MAINWARING W.I.P., Endocrinol. , 1969, 45, 531.

80 - BAULIEU E.E., JUNG I., Bioch. Bioph. Res. Comm., 1970, 38, 599.

81 - RENNIEP., BRUCHOWSKY N., J. Biol. Chem., 1972, 247, 1546.

82 - BAULIEU E.E., ROBEL P., "Griffiths K. Ed., Some aspects of acthiology and biochemistry of prostatic cancer", Cardiff, 1970.

83 - UNJHEM O., TVETER K.J., Acta Endocrin., 1969, 60, 571.

84 - FANG S., LIAO S., J. Biol. Chem., 1971, 246, 16.

85 - MANGAN F.R., NEAL G.E., WILLIAMS D.C., Arch. Bioch. Bioph., 1968, 124,27.

86 - DIRSCHERL W., Coll. Ges. Physiol. Chem., 1955, 5, 62.

87 - HECHTER O., Vitam. and Horm., 1955, 13, 293.

88 - KARLSON P., Perspectives Biol. Med., 1963, 6, 203.

89 - JENSEN E.V., De SOMBRE E.R., Annual.Review of Biochem., 1972, 203.

90 - SUTHERLAND E.W., OYE I., BUTCHER R.W., Recent Prog. Horm. Res., 1965, 21, 263.

91 - HAYNES R.C. Jr, SUTHERLAND E.W., ROLL T.W., Rec. Prog. Horm. Res., 1960, 16, 121.

92 - DAVOREN P.R., SUTHERLAND E.W., J. Biol. Chem., 1963, 238, 3016.

93 - HARRIS G.W., Physiol. Rev., 1948, 28, 139.

94 - SCHÖNEMANN A., Arch. Path. Anat., 1892, 129, 310.

95 - THOM, Arch. Mikroskop. Anat., 1901, 57, 632.

96 - BENDA C., Berlin Klin. Wochschr., 1900, 37, 1205.

97 - ROMEIS B., Handbuch der Mikroskopy Anat. des Meuschen, VI, 3, 1.

98 - HERLANT, Arch. Biol., 1943, 54, 225.

99 - EZRIN C., MURRAY S., Cytologie de l'adenohypophyse, C.N.R.S., Paris 1963, 183.

100 - FARQUHAR M.G., Anat. Rec., 1957, 127, 291.

101 - PURVES H.D., Sex and Int. Secretions, W.C. Young Ed; 3rd ed., Baillière, London, 1961, 161, 239.

102 - ERDHEIM, ÜBER Hypophysengaggeschwrïlste und Hirncholestestone, Sitzber, Akad. Wiss. Wien., Math. Nat. Kl., 1904, III, 133, 537.

103 - Mc CANN S.N., TALEISNIK S., FRIEDMAN H.F., Proc. Soc. Exp. Biol., 1960, 104, 432.

104 - COURRIER R., GUILLEMIN R., JUTISZ M., SAKIZ E., ASCHEIM P., C.R. Acad. Sci., Paris, 1961, 253, 922.

105 - GUILLEMIN R., JUTISZ M., SAKIZ E., C.R. Acad. Sci., Paris, 1963, 256, 504.

106 - MOORE C.R., PRICE D., Amer. J. Anat., 1932, 50, 13.

107 - KATO J., VILLEE C.A., Endocrinology, 1967, 80, 567.

108 - EISENFELD A.J., Bioch. Bioph. Acta, 1967, 136, 498.

109 - VERTES M., KING R.J.B., Endocrinol. , 1971, 51, 271.

110 - Mc GUIRE J.L., LISK R.D., Neuroendocrinology, 1969, 4, 289.

111 - STUMPF W.E., Z. Zellforsch Mikrosk. Anat., 1968, 92, 23.

112 - ANDERSON C.H., GREENWALD G.S., Endocrinology, 1969, 85, 1160.

113 - ATTRAMADAL A., Z. Zellforsch Mikrosk. Anat., 1970, 104, 597.

114 - STUMPF W.E., Science, 1968, 162, 1001.

115 - ATTRAMADAL A., Z. Zellforsch Mikrosk. Anat., 1970, 104, 572.

116 - EISENFELD A.J., Nature, 1969, 224, 1202.

117 - EISENFELD A.J., Endocrinology, 1970, 86, 1313.

118 - KAHWANAGO I., HEINRICHS W.L., HERMANN W.L., Endocrinology, 1970, 86, 1319.

119 - MOWLES T.F., ASHKANAZY B., MIX E., SHEPPARD J.H., Endocrinology, 1971, 89, 484.

120 - KATO J., ATSUMI Y., INABA M., J. Biochem., 1970, 68, 759.

121 - KATO J., ATSUMI Y., MURAMATSO M., J. Biochem., 1970, 67, 871.

122 - SAR M., STUMPF W.E., Experientia, 1972, 28/11, 1364.

123 - WHALEN R.E., LUTTGE W.G., GREEN R., Endocrinology, 1969, 84, 218.

124 - BARNEA A., WEINSTEIN A., LINDNER H.R., Brain Res., 1972, 46, 391.

125 - Mc EWEN B.S., PFAFF D.W., Brain Res., 1970, 21, 17.

126 - ROY S.K., LAUMAS K.R., Acta Endocr., 1969, 61, 629.

127 - RESKO J., GOY R., PHOENIX C., Endocrinology, 1967, 80, 490.

128 - WHALEN R.E., LUTTGE W.C., Neuroendocr., 1970, 6, 255.

129 - KREBS H.A., Biochim. Biophys. Acta, 1950, 4, 249.

130 - HANSSON V., Acta Endocr., 1971, 68, 89.

131 - MONBON M., LORAS B., REBOUD J.P. and BERTRAND J., Brain Res., 1973, 139.

132 - KATO J., Acta Endocr., 1970, 64, 687.

133 - ROSENBERG L., BLAIR A., SEGAL S., Biochim. Biophys. Acta, 1961, 54, 479.

134 - KATO J., Proc. Third Intern. Congress Hormonal Steroids, Excerpta med. (Amst) Intern. Congr. Series N° 219, 1971, 767.

135 - RENNIE P.,BRUCHOWSKY N., J. Biol. Chem., 1972, 247, 3288.

136 - GIORGI E.P., STEWART J.C., GRANT J.K., SCOTT R., Biochem. J., 1971, 123, 41.

137 - KATO J., VILLEE C.A., Endocrinology, 1967, 80, 1133.

138 - GURPIDE E., WELCH M., J. Biol. Chem., 1969, 244, 5159.

139 - SAR M., STUMF W.E., Endocrinology, 1973, 92, 631.

140 - EISENFELD A.J., AXELROD J., Biochem. Pharmacology, 1967, 16, 1781.

141 - KOCHAKIAN Ch., STIDWORTHY G., J. Biol. Chem., 1952, 199, 607.

142 - LOWRY O., ROSEBROUGH N., FARR A., RANDALL R., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.

143 - ATGER M., BAULIEU E.E., MILGROM E., Endocrinology, 1974, 94, 161.

144 - ROMMERTS F., VAN DER MOLEN J., Biochim. Biophys. Acta, 1971, 248, 489.

145 - LAURENT T.C., KILLANDER J., J. Chromatog., 1964, 14, 317.

146 - FOLCH J., LEES M., STANLEY S., J. Biol. Chem., 1957, 226, 497.

147 - KOWARSKI A., SHAFF J. and MIGEON Cl., J. Biol. Chem., 1969, 244, 5269.

148 - SAVARD K., J. Biol. Chem., 1953, 202, 457.

149 - BRAY C., Anal. Biochem., 1960, 1, 279.

150 - ANDREWS P., Biochem. J., 1964, 91, 222.

151 - ACKERS G.K., Biochemistry, 1964, 3, 723.

152 - ROBEL P., Proc. Third Intern. Congr. Hormonal Steroids, Excerpta med. (Amst.), Intern. Congr. Series n° 219, 1971, 357.

153 - SCATCHARD G., Annal. Acad. Sci. N.Y., 1949, 51, 660.

154 - ROSENTHAL H., Anal. Biochem., 1967, 20, 525.

155 - MERCIER L., THIEULANT M.L., SAMPEREZ S., and JOUAN P., I.R.C.S., 1974, 2, 1307.

156 - RAO R.R., WIEST W.G., ALLEN W.R., Endocrinology, 1973, 92, 1229.

157 - NAESS O. and ATTRAMADAL A., Acta Endocr., 1974, 76, 417.

158 - KATO J. and ONOUCHI T., Endocr. Japonica, 1973, 20, 641.

159 - KATO J. and ONOUCHI T., Endocr. Japonica, 1973, 20, 429.

160 - GINSBURG M., GREENSTEIN B.D., Mac LUSKY N.J., MORRIS J.D. and THOMAS P.J., J. Endocrinology, 1974, Proc. of the Soc. of Endocr. XXIV.

161 - VALOTAIRE Y. et DUVAL J., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 224, 63.

162 - WIRA C.W., ROCHEFORT H., BAULIEU E.E., Karolinska Symposia, Acta Endoc., 1971, Suppl. 153, 223.

163 - MARTIN R.G., AMES B.N., J. Biol. Chem., 1961, 236, 1372.

164 - SIEGEL L.M., MONTY K.J., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 112, 346.

165 - O'MALLEY B.W., Metabolism, 1971, 20, 981.

166 - HANSSON V., Steroids, 1972, 20, 575.

167 - BEST-BELPOMME M., ERDOS T., C.R. Acad. Sci., Paris, 1970, 270, 2377.

168 - MAINWARING W.I.P., Proc. Third Intern. Congr. Hormonal Steroids, Excerpta Med. (Amst.), Intern. Congr. Series n° 219, 1971, 368.

169 - DOE R.P., SEAL U.S., J. Clin. Invest., 1963, 42, 929.

170 - MURPHY B.E.P., Can. J. Biochem., 1968, 46, 299.

171 - LEA O.A. and STØA K.F., J. Steroid Biochem., 1972, 3, 409.

172 - PEREZ-PALACIOS G., CASTANEDA E., GOMEZ-PEREZ F., PEREZ and GUAL C., Biology of Reproduction, 1970, 3, 205.

173 - UNJHEM O., Acta Endocr., 1970, 63, 69.

174 - SHOLITON L., WERK E., Acta Endocr., 1969, 61, 641.

175 - YASUE S., YAMADA M., MIZUTANI S. and MATSUMOTO K., Endocr. Japonica, 1974, 21, 161.

176 - BINGHAM K., SHAW D., J. Endocr., 1973, 57, 111.

177 - TVETER K.J., AAKVAAG A., Acta Endocr., 1970, 65, 723.

178 - JAFFE R.B., Steroids, 1969, 14, 483.

179 - MASSA R., STUPNICKA E., ZNIEWALD Z. and MARTINI L., J. Steroid Biochem., 1972, 3, 385.

180 - ROBEL P., CORPECHOT C., BAULIEU E.E., Febs Letters, 1973, 2, 218.

181 - NGUYEN C. Thien, DUVAL J., SAMPEREZ S., et JOUAN P., Biochimie, 1974, 56, 899.

182 - DENEF C., MAGNUS C. and Mc EWEN B.S., J. Endocr., 1974, 59, 605.

183 - ROBEL P., LASNITZKI I., BAULIEU E.E., Biochimie, 1971, 53, 81.

184 - STEINBERGER E., DUCKETT G., Acta Endocr., 1968, 57, 289.

185 - JONES G.E., BOYNS A.R., J. Endocr., 1974, 61, 123.

186 - SCHALLY A.V., REDDING T.W., ARIMURA A., Endocrinology, 1973, 93, 893.

187 - ZANISI M., MOTTA M., MARTINI L., J. Endocr., 1973, 56, 315.

188 - DENEF C., MAGNUS C., Mc EWEN B., Endocrinology, 1974, 94, 1265.

189 - BULLOCK L.P., BARDIN C.W., Endocrinology, 1974, 94, 746.

190 - THOMAS P.J., J. Endocr., 1973, 57, 333.

191 - FREDERIKSEN D.W. and WILSON J.D., J. Biol. Chem., 1971, 246, 2584.

192 - WIDNELL C. and TATA J., Biochem. J., 1964, 92, 313.

193 - DUTTON G., MAHLER H., J. Neurochem., 1968, 15, 765.

194 - LAWSON D.E.M., WILSON P.W., BARKER D.C., and KODICEK E., Biochem. J., 1969, 115, 263.

195 - MUNRO H.N., FLECK A., Methods of Biochem. Analysis, Vol. XIV, Glick D., Edit. Intersciences Publishers, N-York, 1965, 113.

196 - VALOTAIRE Y. et DUVAL J., Bull. Soc. Chim. Biol., 1969, 51, 1233.

197 - MEJBAUM W., HOPPE SEYLER'S., Phys. Chem., 1939, 258, 117.

198 - CERIOTTI G., J. Biol. Chem., 1952, 198, 297.

199 - WILHEM X., CHAMPAGNE M., Europ. J. Biochem., 1969, 10, 102.

200 - LØVTRUP-REIN H. and Mc EWEN B.S., J. Cell. Biol., 1966, 30, 405.

201 - SPORN N.B., WANKO Th., DINGMAN W., J. Cell. Biol., 1962, 15, 109.

202 - BALAZS , Biochem. J., 1965, 95, 497.

203 - JOHNS E.W., FORRESTER S., European J. Biochem., 1969, 8, 547.

204 - KING R., GORDON J. and STEGGLES A., Biochem. J., 1969, 114, 649.

205 - KORNEL L., Acta Endoc., 1973, 74, Supplém. 178.

206 - O'MALLEY B., SPELSBERG Th., SCHRADER W., CHYTIL F. and STEGGLES A., Nature, 1972, 235, 141.

207 - GIANNOPOULOS G. and GORSKI J., J. Biol. Chem., 1971, 246, 2530.

208 - LORAS B., GENOT A., MONBON M., BUECHER F., REBOUD J.P. and BERTRAND J., J. Steroid Biochem., 1974, 5, 425.

209 - MOORE J. and WILSON J., J. Biol. Chem., 1972, 247, 958.

210 - VERHOEVEN G. and De MOOR P., Endocrynology, 1972, 91, 54.

211 - YAMAMOTO and ALBERTS, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 1972, 69, 2105.

212 - ANDRE J., ROCHEFORT H., Febs Letters, 1973, 32, 330.

213 - BAXTER J.D., ROUSSEAU G.G., BENSON M.C., GARCEA R.L., ITO J., TOMKINS G.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1972, 69, 1892.

214 - PUCA G.A., SICA V., and NOLA E., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1974, 71, 979.

215 - LIAO S., YANG T., TYMOCZKO J.L., Nature N.B., 1973, 241, 211.

216 - SCHRADER W.T., TOFT D.O., O'MALLEY B., J. Biol. Chem., 1972, 247, 2401.

217 - O'MALLEY B. and MEANS A.R., Science, 1974, 183, 610.

218 - JENSEN E.V. and De SOMBRE E.R., Science, 1973, 182, 126.

219 - BLONDEAU J.P., CORPECHOT C., J. Steroid Biochem., 1974, 5, 332.

220 - PASQUALINI J.R., SUMIDA C. and GELLY C., Acta Endocr., 1974, 77, 356.

221 - DAVIES P., GRIFFITHS K., Biochem. J., 1973, 136, 611.

222 - RAYNAUD-JAMMET C., BAULIEU E.E., C.R. Acad. Sci., 1969, D268, 3211.

223 - STEIN G.S., SPELSBERG T.C., KLEINSMITH L.J., Science, 1974, 183, 817.

224 - KINGSLEY T.R. and BODGANOVE E.M., Fed. Proc., 1971, 30, 253.

225 - SMITH E.R. and DAVIDSON J.M., Endocrinology, 1974, 95, 1566.

226 - DEBELJUK L., VILCHEZ-MARTINEZ J.A., ARIMURA A. and SCHALLY A.V., Endocrinology, 1974, 84, 1519.

VU :

Le Président de la Thèse

P. JOUAN

VU :

Le Directeur de Thèse

P. JOUAN

VU et APPROUVE

RENNES, le 10 Mars 1975

Le Directeur de l'U.E.R.

J. MEINNEL

VU pour autorisation de soutenance

RENNES, le

Le Président de l'Université de RENNES,

C. CHAMPAUD